



Universidad Autónoma de
Madrid
Facultad de Ciencias

LIGNOSULFONATOS DE Zn ADHERIDOS EN NPK COMO FERTILIZANTES EN CULTIVOS DE TRIGO Y MAÍZ

Memoria para optar al
grado de doctor
presentada por:

Diego Martín Ortiz

Madrid, 2009



LIGNOSULFONATOS DE Zn ADHERIDOS EN NPK COMO FERTILIZANTES EN CULTIVOS DE TRIGO Y MAÍZ.

**Diego Martín Ortiz
Madrid, 2009**



Universidad Autónoma de Madrid.

Facultad de Ciencias.

**Lignosulfonatos de Zn adheridos en NPK como
fertilizantes en cultivos de Trigo y Maíz.**

Memoria presentada para optar
al grado de Doctor en Química:

Fdo.: Diego Martín Ortiz

Director Tesis:

Co-directora Tesis:

Fdo.: Agustín Gárate Ormaechea
Catedrático del Departamento de
Química Agrícola de la Universidad
Autónoma de Madrid.

Fdo.: Lourdes Hernández Apaolaza
Profesora Titular del Departamento
de Química Agrícola de la Universidad
Autónoma de Madrid.

El presente trabajo es resultado del desarrollo de los siguientes proyectos de investigación financiados por la empresa española de fertilizantes Fertiberia S.A.:

- “Diseño de nuevos fertilizantes complejos minerales NPK, con incorporación de micronutrientes complejados” (Agosto 04 – Agosto 08)
- “Nuevos productos y técnicas de fertilización para mejora de la productividad del suelo y su conservación” (Agosto 08 – Agosto 09)

Parte de dicho trabajo ha sido presentado en los siguientes congresos:

- “Eficiencia de un lignosulfonato de zinc como fuente de este elemento para plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) en condiciones de hidroponía pura”. Comunicación Poster. En: “XII Simposio Ibérico de Nutrición Mineral de los Cultivos”. Granada, Octubre 2008.
- “Zinc lignosulfonate as zinc source for maize (*Zea mays* L.) under hydroponic conditions”. Comunicación Poster. En “17th International symposium of the CIEC: Plant Nutrient Management Under stress conditions”. El Cairo, Noviembre 2008.
- “Eficacia de un NPK recubierto con lignosulfonato de zinc como fertilizante de Zn para maíz (*Zea mays* L.). Ensayos en perlita y suelo”. Comunicación Oral. En “XI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. XVIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV)”. Zaragoza, Septiembre 2009.

Además, parte del trabajo presentado, ha sido publicado o está siendo objeto de revisión en revistas científicas de ámbito internacional con los siguientes títulos:

- Martin-Ortiz, D.; Hernandez-Apaolaza, L.; Garate, A. Efficiency of a Zinc Lignosulfonate as Zn source for Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Maize (*Zea mays* L.) under hydroponic culture conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 226-231. DOI: 10.1021/jf8030869.
- Martin-Ortiz, D.; Hernandez-Apaolaza, L.; Garate, A. Efficiency of a NPK Fertilizer with Adhered Zinc Lignosulfonate as a Zinc Source for Maize (*Zea mays* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 9071-9078. DOI: 10.1021/jf9017965.
- Martin-Ortiz, D.; Hernandez-Apaolaza, L.; Garate, A. Efficiency of a Zinc Lignosulfonate Adhered to NPK Fertilizer as a Zinc Source for Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Send to: Field Crops Research* (November, 2009).

Son muchas las personas sin las cuales este trabajo no habría salido a flote. Espero citar a la mayoría de ellas sino es así daros por agradecidos; podéis sentir os orgullosos de haber colaborado en la consecución de mi sueño.

En primer lugar me gustaría agradecer a mi tutor y director de tesis, Agustín Gárate, su dedicación no solo al proyecto sino también a mi preparación como Doctor. Solo estando cerca de personas con tantos conocimientos te das cuenta de que es tan importante lo que cuentas como la forma de transmitirlo.

También a mi co-directora, Lourdes Hernández, por las innumerables horas corrigiendo (y enviando) los trabajos científicos y por tener ese optimismo que en ocasiones le falta al novato y te da el aporte de moral necesario para seguir adelante.

Al resto de profesores del Departamento de Química Agrícola: Ramón Carpena, Elvira Esteban, Rosa M^a Esteban, Enrique Eymar, M^a Ángeles Martín, Ignacio Martín, Esperanza Mollá, Jesús Peñalosa, Eugenio Revilla, M^a José Sarro, Pilar Zornoza. Por sus enseñanzas y compañía durante mi estancia en el Departamento. A Juan José Lucena, por sus consejos sobre los “guarrinatos” y por dejarme formar parte de su grupo.

A la empresa Fertiberia S.A. en general, y en particular a sus departamentos: “Planificación estratégica”, Isabel Tejerina, Pilar García; “I+D+i”, Javier Brañas, Pablo del Campo, Cinta; “Servicio Agronómico”, Javier Paloma, José Ángel Cortijo, Helenio Gimeno, Ana Pilar Embid; “Laboratorio Agronómico”, Javier García. Sin olvidarme de Guillermo Sicilia, un pozo de sabiduría.

A mis compañeros y compañeras de Departamento que han sido muchos. Mis chicas: Patri (!Vamos, que nos vamos!), Diana (que emigra a sus orígenes), Paloma (tu te quedas), Sandra (que no “Sardi”). Mis chicos: Edu (el “arreglalotodo” del Departamento), Iván (ya en otros asuntos). Al personal y PAS del Departamento: Bienve, Nadia, María, Olga. El resto: Ana, Cova, Cris, Carlos, Tere, Rebe, Yoly, Vanesa, María Prieto, Saúl, María Villén, y un largo etc..., incontables para decir una palabra de cada uno, aunque pueda decir una palabra de todos: Gracias.

A mis amigos: Fede, Folga, Iván, Saúl, Sanchis, Juanky, Javi, Juan, Sergio, Juanjo, Isidro. De vosotros solo puedo decir que nunca eslabones tan distintos formaron una cadena tan fuerte.

A mi familia y en especial a mi hermana Virginia; aunque soy un poco arisco ya sabes que te quiero mucho.

A mis padres: Matías y Sagrario. ¿Se puede agradecer a alguien más que el hecho de haberte dado la vida?, en mi caso si. Tengo que agradecerles que me hayan dado todo lo que he deseado poniendo como hipoteca su vida y su esfuerzo. Sin ellos, no solo este trabajo estaría inconcluso, sino también lo estarían mi personalidad y afán de superación fruto del sentido del esfuerzo que ellos me han inculcado.

A Enna, aunque nuestros caminos se hayan separado es justo que agradezca a la persona que ha aguantado las mayores sombras de la Tesis con paciencia y cariño. Gracias desde el interior que tan bien conoces.

En general a todos los que se han visto influenciados o han influenciado el desarrollo de este trabajo... y a ti que te estas tomando la molestia de leerlo.

Gracias.

“En memoria de mis abuelos y de mi tío Enrique”

“A la naturaleza se la domina obedeciéndola” (Francis Bacon)

ESTRUCTURA DE LA MEMORIA

El trabajo que se presenta a continuación está estructurado en nueve apartados, que se detallan en los siguientes párrafos (para facilitar la comprensión del mismo).

La introducción (Apartado I) recoge los antecedentes sobre el problema agrícola/nutricional que supone la deficiencia de zinc en cultivos cerealistas mundiales, así como la necesidad de mitigar dicho problema mediante la aplicación de productos que mejoren los ya existentes. La introducción hace una breve revisión de la necesidad de aportar a los cultivos los elementos necesarios para su correcto desarrollo, ya sean macro- o micronutrientes. En este apartado se hace especial énfasis en la importancia de una correcta nutrición con zinc, repasando sus funciones en la planta, estado natural en suelos, metodologías para determinar su deficiencia en los mismos, sintomatología y efecto de su deficiencia en cultivos, etc.... Finalmente, se propone la utilización de complejos naturales de zinc como alternativa a sales inorgánicas o quelatos sintéticos, como correctores y/o preventores de la deficiencia de este elemento. Dentro de estos complejos, se destaca el lignosulfonato que es un sub-producto de la industria papelera y que formando complejo con el zinc es un producto comercial presente de manera relevante en el mercado español desde el año 2000.

En los siguientes Apartados se evalúa la posibilidad de utilizar un producto lignosulfonato de zinc como fuente de este elemento para trigo y maíz vía radical. En el Apartado II se selecciona un producto lignosulfonato comercial de entre tres opciones, en función de su capacidad para complejar al zinc en su estructura. La eficacia de este producto como fertilizante se comprueba para trigo y maíz en un cultivo hidropónico puro a dos valores de pH. En los Apartados III y IV también se evalúa la capacidad del lignosulfonato de zinc para aportar este micronutriente a trigo y maíz. La diferencia es que

en estos Apartados el fertilizante se aplica en estado sólido y adherido a un fertilizante (de macronutrientes) complejo mineral NPK. Estos trabajos se sub-dividen en ensayos con distintos dispositivos experimentales: perlita, suelo y campo; donde la interacción sustrato-fertilizante-planta va aumentando.

Para terminar, en el Apartado V del trabajo se pretende preparar y evaluar un lignosulfonato de manganeso como fertilizante aplicando la metodología experimental empleada con el Zn. Para ello, se selecciona un lignosulfonato, se prepara un complejo lignosulfonato de manganeso y se evalúa su eficiencia como fuente del micronutriente, tanto en condiciones de hidroponía, como integrado en un NPK.

Glosario de Tablas, Figuras, Gráficos e Imágenes por orden de aparición.

Figura I-1. Balance de nutrientes en planta.....	25
Gráfica I-1. Consumo mundial de fertilizantes entre años 1970 y 2005.....	26
Tabla I-1. Producción de productos minerales en España. Año 2006/07.....	30
Tabla I-2. Consumo de fertilizantes minerales en España. Año 2006/07.....	30
Tabla I-3. Algunos síntomas visuales asociados a deficiencia de microelementos.....	31
Tabla I-4. Índices y medias de zinc total en suelos del mundo.....	35
Gráfica I-2. Especies del Zn en equilibrio con el Zn del suelo en función del pH.....	36
Tabla I-5. Reactivos para extracción de Zn (y otros metales) en suelo.....	39
Imagen I-1. Síntomas de clorosis en hojas de Algodón y necrosis en hoja de Colza.....	41
Imagen I-2. Bronceado en soja y reducción del espacio internodal en manzano.....	41
Tabla I-6. Nivel crítico de Zn en algunos cultivos.....	42
Imagen I-3. Síntomas de clorosis en plantas de trigo.....	43
Imagen I-4. Síntomas de clorosis en plantas de maíz.....	44
Figura I-2. Modelo aproximado de una molécula de ácido húmico.....	47
Figura I-3. Fórmula del ácido glucónico.....	48
Figura I-4. Ejemplo estructural de un aminoácido: el triptófano.....	48
Figura I-5. Molécula de ácido cítrico.....	49
Figura I-6. Modelo de la estructura aproximada de la lignina.....	50
Figura I-7. Ejemplo unidad estructural típica de Lignosulfonato.....	51
Gráfica I-3. Evolución del número de productos correctores de carencia de Zn en el mercado español (2000-2009).....	53
Gráfica I-4. Evolución del porcentaje de productos complejos de Zn en el mercado español en función del agente complejante utilizado (2000-2009).....	54
Figura I-8. Esquema proceso de obtención de celulosa a partir de madera por el método al sulfito.....	56
Tabla I-7. Distribución de los principales usos de los lignosulfonatos.....	57
Table III-1. Physicochemical characteristics of the lignosulfonates tested.....	81
Figure III-1. Complexing capacity of lignosulfonates with Zn.....	85
Table III-2. Zinc-complexing capacity and LS/Zn ratio of three commercial lignosulfonates.....	86
Table III-3. Plant parameters in hydroponic wheat experiment at pH 7.0.....	88
Table III-4. Plant parameters in hydroponic wheat and corn experiments at pH 8.0.....	91

Figure IV-1. Infrared spectrum of spruce ammonium lignosulfonate (NH ₄ -LS).....	104
Table IV-1. Physicochemical characteristics of the soils used.....	110
Table IV-2. Total and AB-DTPA Zn in the NPK-Zn adhered products in maize experiments.....	114
Figure IV-2. Ammonium bicarbonate-DTPA Zn measured at different depths of perlite columns...	117
Figure IV-3. Phosphorus concentration measured in the leached solution of the perlite columns....	118
Table IV-3. Plant parameters in maize perlite and soil experiments.....	119
Figure IV-4. Ammonium bicarbonate-DTPA extractable Zn measured at two different depths at the end of the maize perlite and soil experiments.....	121
Table IV-4. Plant parameters in maize field experiments.....	125
Table V-1. Characteristics of soil used in wheat soil greenhouse and field experiments.....	141
Table V-2. Total and AB-DTPA Zn in the NPK-Zn adhered products in wheat experiments.....	145
Table V-3. Plant parameters in wheat perlite and soil experiments.....	147
Figure V-1. Ammonium bicarbonate-DTPA extractable Zn measured at two different depths at the end of the wheat perlite and soil experiments.....	149
Figure V-2. Zinc concentration and P/Zn ratio of wheat shoots at field experiment.....	154
Figura VI-1. Capacidad de complejación de Mn en el NH ₄ -LS de eucalipto.....	173
Tabla VI-1. Parámetros medidos en trigo y maíz de ensayos hidropónicos con MnLS.....	175
Tabla VI-2. Coeficiente de eficiencia de fertilizantes de Mn utilizados en hidroponía.....	179
Tabla VI-3. Concentraciones de Mn total y coeficientes de variación del Mn en NPK.....	180
Tabla VI-4. Parámetros medidos en trigo de ensayos en perlita con NPK+MnLS (0,1 y 1,0% Mn). ..	182
Figura VI-2. AB-DTPA Mn extraído de la perlita a dos profundidades de los dispositivos experimentales al finalizar el ensayo con trigo.....	184
Tabla VI-5. Coeficiente de eficiencia en fertilizantes NPK+Mn.....	185
Figura VII-1. Espectros de IR de un NH ₄ -LS procedente de abeto sin Zn añadido y en su máxima capacidad de complejación con Zn.....	191
Tabla VII-1. Eficacia fertilizante de Zn de los tratamientos aplicados a plantas de trigo y maíz en cultivo hidropónico puro.....	192
Tabla VII-2. Coeficiente de variación (CV) de Zn (Mn) total de los productos aplicados en los ensayos biológicos.....	196
Tabla VII-3. Relación P/Zn medida e incrementos de peso seco en la parte aérea de las plantas....	198
Tabla VII-4. Coeficientes de correlación de Pearson entre el Zn extraído por AB-DTPA y el efecto de la aplicación en trigo y maíz de los productos aplicados.....	202
Tabla VII-5. Coeficiente de eficiencia de fertilizantes NPK+Zn.....	205

I.- Introducción.....	18
II.- Objetivos.....	66
III.- Efficiency of a Zinc Lignosulfonate as Zn Source for Wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) and Corn (<i>Zea mays</i> L.) under Hydroponic Culture Conditions.....	70
IV.- Efficiency of a NPK Fertilizer with Adhered Zinc Lignosulfonate as a Zinc Source for Maize (<i>Zea mays</i> L.).....	96
V.- Efficiency of a Zinc Lignosulfonate Adhered to a NPK Fertilizer as Zinc Source for Wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	130
VI.- Eficacia de un Fertilizante NPK con Lignosulfonato de Manganeso Adherido como Fuente de Mn para Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.) y Maíz (<i>Zea mays</i> L.).....	158
VII.- Discusión General.....	187
VIII.- Conclusiones.....	207
IX.- Bibliografía.....	211

I.- INTRODUCCIÓN

1.- Antecedentes.....	21
2.- Fertilización cultivos.....	23
2-1.- Fertilización con macronutrientes.....	26
2-2.- Fertilización con micronutrientes.....	30
3.- La deficiencia de zinc en los cultivos y en la nutrición humana.....	32
3-1.- El zinc en el suelo.....	33
3-1-1.- Distribución del zinc en el suelo y métodos de análisis.....	34
3-2.- El zinc en las plantas.....	38
3-2-1.- Indicadores de la deficiencia de zinc en plantas.....	39
3-2-2.- Deficiencia de zinc en Trigo y Maíz.....	42
4.- Correctores de la deficiencia de zinc.....	44
4-1.- Agentes complejantes de microelementos.....	45
4-1-1.- Legislación.....	50
4-1-2.- Mercado español de complejos de zinc.....	52
4-2.- Lignosulfonatos.....	54
4-2-1.- Uso agrícola de los Lignosulfonatos.....	57
4-2-2.- Lignosulfonato de zinc.....	58

1.- Antecedentes

Según estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2006), en el año 2020 la población mundial alcanzará los 7600 millones de habitantes, es decir un 31 % más de los 5800 millones que existían en 1996. Para aumentar la cantidad y la calidad de los alimentos a fin de cubrir las necesidades crecientes, hay que intensificar la producción agrícola. Para esto la sociedad debe implicarse en la introducción de nuevas tecnologías para desarrollar una agricultura más moderna: aplicando variedades de cultivos más productivas, usando fertilizantes y plaguicidas, mecanizando la agricultura, irrigando los cultivos..., todo dentro de un contexto controlado y sostenible.

La producción de alimentos mundial presenta varias limitaciones, entre ellas está la deficiencia de zinc. De acuerdo con un informe de la *“World Health Organization”* (WHO, 2004) en 2002, la deficiencia de zinc ocupó el 11º puesto en las causas de muerte en la población de los países desarrollados y el 5º en países en vías de desarrollo. Así, la mitad de las explotaciones cerealistas mundiales se cultivan en suelos con cantidades insuficientes de zinc. Esta deficiencia provoca el descenso tanto en las cosechas como en la calidad del grano recolectado, con lo que la deficiencia de zinc en humanos en zonas donde la alimentación es eminentemente cerealista.

Los productos generalmente empleados en corrección de carencias de zinc de los cultivos son sales inorgánicas y quelatos sintéticos. Las sales inorgánicas,

como sulfatos o cloruros, tienen el inconveniente de no ser eficientes en ciertos suelos, donde el zinc queda poco disponible para los cultivos. También se emplean quelatos sintéticos derivados de los ácidos poliaminocarboxílicos que presentan una gran estabilidad. No obstante, su elevado coste hace que sólo se empleen en cultivos de alto valor añadido. Otro problema de estos productos es que su elevada estabilidad aumenta la probabilidad de que puedan ser arrastrados a acuíferos donde se pueden acumular.

Actualmente, se están planteando nuevas vías para la corrección de deficiencias de zinc que atiendan además a la necesidad de una agricultura respetuosa con el medio. Una de ellas es el uso de agentes complejantes basados en materiales que, generalmente, son subproductos de otras industrias con una estabilidad intermedia entre las sales inorgánicas y los quelatos sintéticos. La utilización de estos compuestos proporciona productos biodegradables que solucionan los problemas de carencias nutricionales en los cultivos y permiten una reutilización de residuos en las empresas productoras. Además, estos agentes complejantes son más baratos que los quelatos sintéticos con lo que la corrección de una posible carencia sería viable en cultivos extensivos. Así, teóricamente las ventajas que aportaría la aplicación de estos complejos como fertilizantes de zinc serían económicas y ambientales.

2.- Fertilización cultivos

El ser humano ha venido añadiendo elementos minerales a los suelos para mejorar el crecimiento y desarrollo de los cultivos desde hace más de 2000 años (Marschner, 1995). Pero es en el siglo XIX, cuando Justus von Liebig establece, basándose en numerosos ensayos, la nutrición mineral de los cultivos como una disciplina científica. El término de elemento esencial se propuso años después por Arnon y Stout (1939), que denominaron “*elemento esencial*” a aquel sin el cual la planta no pudiese terminar su ciclo vital, que no pudiese ser reemplazado por ningún otro y que estuviese directamente involucrado en procesos metabólicos o enzimáticos. De acuerdo a estas premisas se establecieron 14 elementos esenciales, divididos a su vez, por su concentración relativa en las plantas: los llamados macronutrientes, generalmente medidos en concentraciones superiores, serían: nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, magnesio y calcio; por otra parte, el grupo de elementos denominados micronutrientes, oligoelementos o traza, que se encuentran en cantidades más bajas lo conformarían: el hierro, manganeso, zinc, cobre, boro, molibdeno, cloro y níquel.

Las continuas salidas y entradas de estos nutrientes en el sistema suelo-planta se denomina en algunos ámbitos como “ciclo de nutrientes” (NRC, 1989). La

Figura I-1 muestra una versión simplificada de este ciclo.

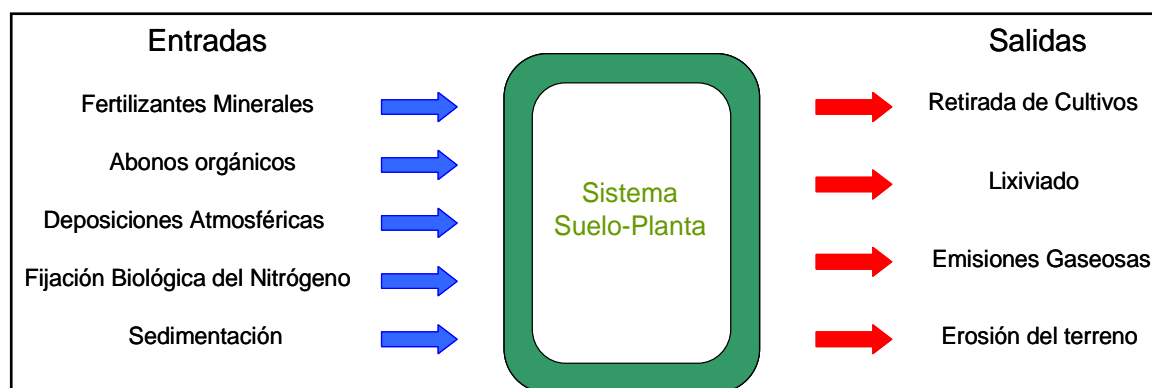


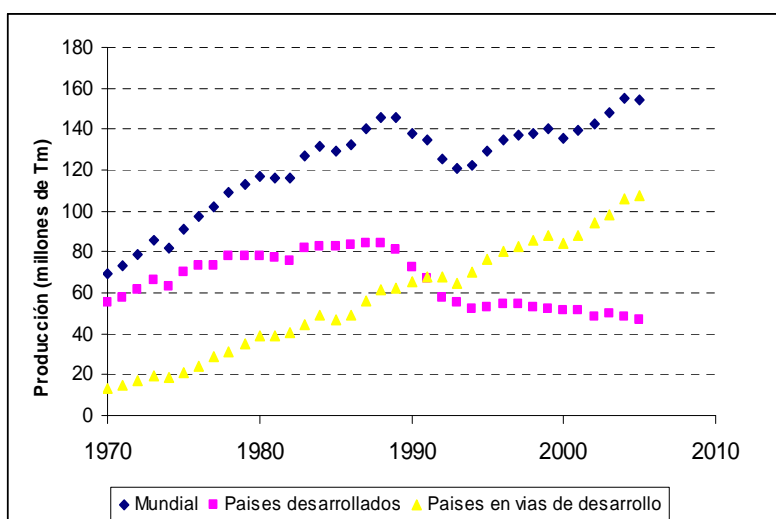
Figura I-1. Balance de nutrientes en planta (Smaling, 1993)

El ciclo se divide en dos partes: “Entradas” que representan algunas de las adiciones de nutrientes más comunes al sistema suelo-planta y “Salidas” que representan los factores que exportan los nutrientes desde dicho sistema al exterior (suelo, capas freáticas, atmósfera...). La diferencia entre “Entradas” y “Salidas” constituye el balance de nutrientes del cultivo. Balances negativos pueden indicar que el suelo está siendo sobreexplotado y que el sistema de producción utilizado no es sostenible. Esto puede originar obtención de cosechas pobres y de baja calidad. Debido a esto se hace necesaria la reposición de nutrientes mediante la aplicación de fertilizantes orgánicos y/o inorgánicos para aumentar la fertilidad del suelo y volver así al equilibrio del balance. Un balance negativo también puede indicar que los nutrientes se están perdiendo y se está contaminando el medio.

Algunos autores como Wood y col. (2000) y Foley y col. (2005) estimaron que aproximadamente el 12% del incremento agrícola mundial se debió al aumento de superficie cultivada; pero que la mayor parte del incremento fue producido en la llamada “Revolución Verde”. Esta revolución implicó la inclusión de nuevas

tecnologías para desarrollar una agricultura sostenible: aplicando variedades más productivas, usando fertilizantes y plaguicidas, mecanizando la agricultura e irrigando los cultivos, todo dentro de un contexto controlado y sostenible. Dentro de estas tecnologías, el uso de fertilizantes inorgánicos ha sido uno de los factores clave que ha permitido el incremento de producción mundial de alimentos desde los años 50 (Matson y col. 1997).

El mercado mundial de fertilizantes minerales estuvo dominado, eminentemente, por países desarrollados hasta los años 90. En este año, debido a una crisis económica y al aumento en los costes de fabricación/transporte de fertilizante, el aumento del consumo a escala mundial se ve frenado. Esta crisis en los países desarrollados provocó que los países en vías de desarrollo comenzasen a ocupar las primeras plazas en el consumo mundial de fertilizantes minerales (Gráfica I-1).



Gráfica I-1. Consumo mundial de fertilizantes entre años 1970 y 2005 (IFA, 2006)

Según un pronóstico realizado por Zhang y Zhang (2007), el consumo mundial de fertilizantes minerales podría alcanzar los 226 millones de toneladas en 2030. Esta previsión sobre el consumo de fertilizantes pone de manifiesto la necesidad de mejorar la eficiencia de los productos aplicados a los cultivos.

2-1.- Fertilización con macronutrientes

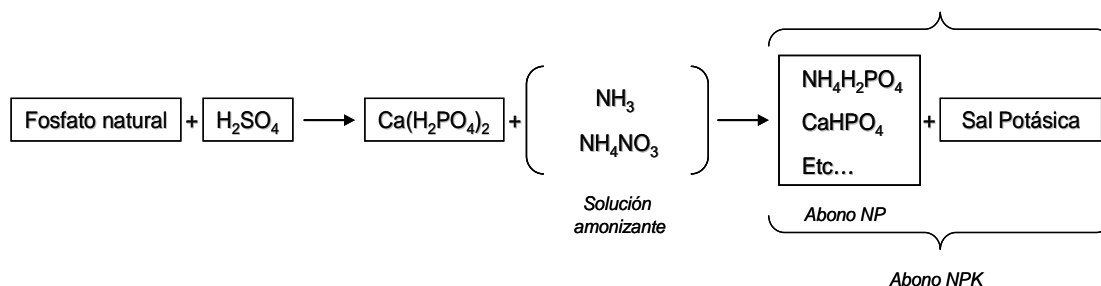
En décadas recientes el aporte de nitrógeno, fósforo y potasio disponibles para los cultivos han sido unos de los factores limitantes en la nutrición mundial de los cereales, que se ha ido sufragando, principalmente con la aplicación de fertilizantes minerales (Ma y col., 2009). En 2004, la producción y el consumo mundial de fertilizantes de N fueron 110 y 106 millones de toneladas respectivamente. Por otro lado, el uso mundial de fertilizantes de P aumentó de 2 millones de toneladas en 1890 a 4 millones en 1950 y a 15 millones en el año 2000 (Zhang y col., 2008). Para finalizar Zhang y Zhang (2007) estimaron que el consumo mundial de fertilizantes de K podría incrementarse un 21% en 2030 respecto al consumo actual.

La correcta aplicación de fertilizantes NPK desempeña un papel crucial en el incremento de la producción de cereales (Hussain y col., 2002). Este hecho se debe a que la aplicación conjunta del N, P y K resulta ser más eficiente que la adición de los macronutrientes por separado (Petkov, 1983; Hussain y col., 2002; Cakmak, 2008). En España, casi la totalidad de los fertilizantes NPK se aplican en forma de abonado de fondo o sementera para la fertilización de cultivos como el trigo y el maíz.

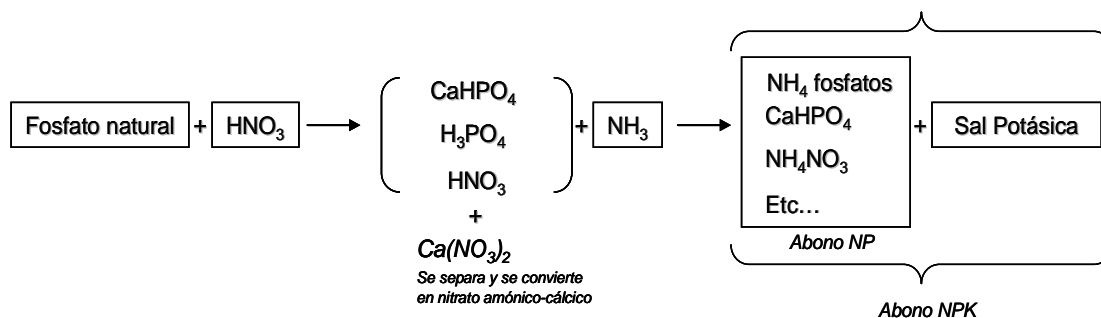
La composición de los abonos NPK se expresa de la siguiente manera: X:Y:Z. Siendo X la riqueza del abono en N, la Y la riqueza en P_2O_5 y Z la riqueza en K_2O . La fracción nitrogenada (N) se compone normalmente de amonio y nitrato, salvo en los casos en los que se incluyen otros compuestos nitrogenados como por ejemplo urea. La fracción fosfatada (P) de muchos abonos NPK se compone de un 30% de fosfatos solubles en agua y un 70% de fosfatos solubles en ácido cítrico. No obstante, la fracción soluble en agua de los abonos basados en superfosfato, está por encima del 50%. La fracción potásica (K) es casi siempre soluble en agua, pues se compone de cloruro o sulfato de K (generalmente se utiliza el sulfato en cultivos sensibles al cloruro) (Finck, 1989).

El procedimiento de fabricación de un abono NPK por ataque de los fosfatos se puede realizar mediante alguno de estos tres procesos (Finck, 1989):

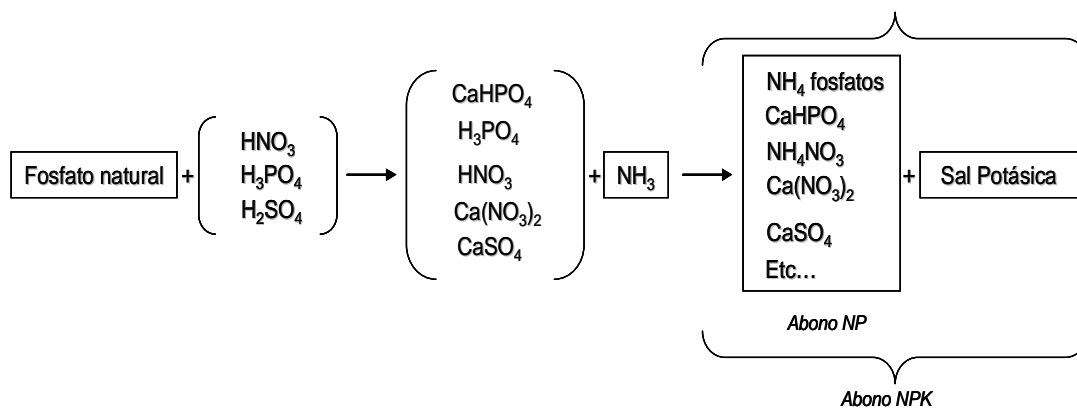
1).- Ataque con ácido sulfúrico y amonización (del superfosfato):



2).- Ataque con ácido nítrico y amonización:

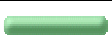







3).- Ataque con mezcla de ácidos y amonización:





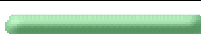




En España, la Asociación Nacional de Fabricantes de Fertilizantes (ANFFE) estimó que la capacidad de producción de fertilizantes complejos minerales (NPK, suspensiones y líquidos) alcanzo la cifra de 1,9 millones de toneladas (2006/07).

Tabla I-1. Producción de productos minerales en España (miles de Tm). Año 2006/07 (ANFFE, 2008)

Sulfato amónico		520
Nitratos amónicos		970
Urea		385
Superfosfatos simples		480
Cloruro potásico		1.250
Abonos complejos		1.900

El porcentaje de producción de los abonos complejos minerales en relación con la producción total de fertilizantes minerales fue 34% en 2006/07. Estos datos muestran que los fertilizantes complejos son los abonos minerales más producidos en España en este período de tiempo dejando unos rendimientos de aproximadamente 500 millones de euros (MAPA). Del mismo modo la ANFFE también determinó que los fertilizantes complejos fueron las formulaciones más consumidas en España en dicho período de tiempo (**Tabla I-2**). El porcentaje, en este caso, sobre el total de productos consumidos ascendió hasta el 41%.

Tabla I-2. Consumo de fertilizantes minerales en España (Miles Tm) 2006/07 (ANFFE, 2008)

Sulfato amónico		390
Nitrosulfato amónico		50
Nitratos amónicos		966
Urea		500
Fosfatados simples		183
Cloruro potásico		227
Abonos complejos		1.974

2-2.- Fertilización con micronutrientes

Hasta el momento se han identificado 8 metales denominados “traza” (o microelementos) esenciales para las plantas superiores: boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni) y el zinc (Zn). Cuando la nutrición de alguno de estos elementos es insuficiente en algún cultivo, la cantidad y calidad de la cosecha recolectada puede sufrir un descenso. La intensidad de este descenso puede variar en función del cultivo y/o la variedad del mismo que se explota, así como del elemento que se encuentre en deficiencia (Alloway, 2008a). La deficiencia de un determinado microelemento puede venir asociada a un síntoma visual, que no siempre fácil de observar (Alloway, 2008a).

Tabla I-3. Algunos síntomas visuales asociados a deficiencia de microelementos (Kabata-Pendias, 1992; Alloway, 2008a)

<i>Elemento</i>	<i>Síntomas</i>	<i>Cultivo sensible a la deficiencia</i>
<i>Boro</i>	Clorosis y pardeamiento hoja joven Floración irregular	Legumbres, <i>brásicas</i> , remolacha, apio, uva, peral, manzano y trigo
<i>Cloruro</i>	Marchitez y necrosis hoja	Kiwi, palma, remolacha azucarera
<i>Cobre</i>	Marchitez y pérdida coloración hoja Lignificación irregular	Cereales, girasol, espinaca, cebolla, zanahoria, alfalfa
<i>Hierro</i>	Clorosis intervenal hoja joven	Cítricos, uva, cacahuete, soja, sorgo
<i>Manganeso</i>	Punto clorótico-necrótico hoja joven Reducción turgor	Cereales, legumbres, manzano, cerezo, cítricos
<i>Molibdeno</i>	Clorosis margen hoja Necrosis y deformación hoja	<i>Brásicas</i> , legumbres
<i>Níquel</i>	Clorosis y punto necrótico hoja	Trigo, nogal, judía, soja, patata
<i>Zinc</i>	Clorosis intervenal hoja Reducción espacio internodal	Cereales, céspedes, algodón, lino, cítricos

Los productos empleados en corrección de carencias de microelementos son generalmente de tres tipos: sales inorgánicas, quelatos sintéticos y complejos naturales. Las sales inorgánicas como sulfatos, cloruros,..., tienen el inconveniente de no ser eficientes en suelos con pH básicos, debido a que se forman hidróxidos insolubles, quedando el elemento poco disponible para los cultivos (Arce y col., 1992).

En ocasiones se emplean quelatos derivados de los ácidos poliaminocarboxílicos como, por ejemplo, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), que presentan una gran estabilidad para suministrar microelementos al cultivo (Brown, 1969). No obstante, su elevado coste hace que sólo se empleen en cultivos de alto valor añadido (Lucena, 2006). Además de esto, su elevada estabilidad puede generar problemas ambientales ya que pueden ser arrastrados a capas freáticas del suelo donde se acumulan (Modaish, 1990 y Álvarez y col., 1996) o pueden quedar retenidos en distintos componentes del suelo (Hernández-Apaolaza y Lucena, 2001).

Actualmente, se están planteando nuevas vías para la corrección de deficiencias de micronutrientes que atiendan además a la necesidad de una agricultura respetuosa con el medio. Una de ellas es el uso de agentes complejantes basados en sustancias que, por lo general, son subproductos de otras industrias. La utilización de estos compuestos, por un lado proporciona productos biodegradables que solucionan los problemas de carencias nutricionales en los cultivos y por otro se reduce el problema del tratamiento de residuos en las empresas de donde son adquiridos. Además estos agentes complejantes son más baratos que los quelatos

sintéticos con lo que la corrección de una posible carencia sería posible en un mayor número de cultivos en los que en la actualidad, apenas se adicionan micronutrientes (Wang y col, 2004) debido al elevado coste del tratamiento.

3.- La deficiencia de zinc en los cultivos y en la nutrición humana

La deficiencia de zinc en las plantas es un problema a nivel mundial, causante del descenso tanto de la producción agrícola como de la calidad nutricional de numerosos cultivos, entre ellos los cereales (White y Broadley, 2005). Esta deficiencia se presenta como uno de los mayores problemas en las explotaciones de maíz y trigo alrededor del mundo (Graham y Welch, 1996; Cakmak y col., 2002; Alloway, 2004).

A pesar de que la esencialidad de algunos elementos traza u oligoelementos en humanos se sigue debatiendo, el “National Research Council” (1989) estableció como elementos esenciales y/o beneficiosos para la nutrición humana al Iodo, Hierro, Selenio y zinc. Así pues, la deficiencia de zinc se ha convertido no solo en un problema para la producción de cultivos sino también para la salud humana, que ingerido en cantidades insuficientes, puede dar lugar a disfunciones fisiológicas que solo se remedian con la ingesta de este elemento (Kiekens, 1995). De acuerdo con un informe de la WHO en 2002, la deficiencia de zinc ocupó el 11º puesto en las causas de muerte en la población de los países desarrollados y el 5º en países en vías de desarrollo. Se estima que aproximadamente la mitad de las explotaciones cerealistas mundiales se cultivan en suelos con cantidades insuficientes de zinc. Esta

deficiencia provoca el descenso tanto en las cosechas como en la calidad del grano recolectado (Cakmak, 2008) pudiendo derivar en casos de deficiencia de zinc en humanos en zonas donde la alimentación es eminentemente cerealista (zonas subdesarrolladas o en vías de desarrollo). Hotz y Brown (2004) estimaron que un tercio de la población mundial se encuentra en riesgo de sufrir desordenes de crecimiento, del sistema inmune y del cerebro asociados a la falta de zinc en la dieta.

3-1.- El zinc en el suelo

La media total de zinc en la litosfera está estimada en 80 mg kg^{-1} (Lindsay, 1979). Las fuentes naturales más abundantes de zinc en la misma son: wurtzita y espalerita (minerales de ZnS), esmitsonita (ZnCO_3), willemita (Zn_2SiO_4), zincita (ZnO), zincosita (ZnSO_4), frankleinita (ZnFe_2O_4) y hopeita [$\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] (Lindsay, 1979). Además del zinc presente en la litosfera de forma natural, determinadas prácticas industriales y agrícolas pueden aumentar las cantidades de zinc en los suelos. Los principales factores antropogénicos que aumentan las cantidades de zinc en el suelo ordenados de mayor a menor importancia son: aplicación de estiércoles > deposiciones atmosféricas provenientes de consumo de combustibles fósiles > adición de fertilizantes minerales > aplicación de compost > vertido de aguas residuales (Kiekens, 1995). Estas prácticas hacen que la media de zinc encontrada en suelo varíe ampliamente (**Tabla I-4**).

Tabla I-4. Índices y medias de zinc total en suelos del mundo (mg kg^{-1}) (Angelone y Bini, 1992)

<i>País</i>	<i>Índices</i>	<i>Media</i>
<i>Alemania</i>	13-492	83
<i>Canadá</i>	-	74
<i>España</i>	10-109	59
<i>Estados Unidos de América</i>	-	54
<i>Francia</i>	5-38	16
<i>Grecia</i>	80-10547	1038
<i>Inglaterra y Gales</i>	-	78
<i>Suecia</i>	100-318	182
<i>Mundo</i>	-	50

Solo una pequeña proporción del Zn total medido en suelos está presente en la disolución del suelo como elemento disponible para las plantas. Kabata-Pendias y Pendias (1992) presentan, basándose en un estudio bibliográfico, valores medios de Zn soluble en suelos de todo el mundo de $4 - 270 \mu\text{g Zn kg}^{-1}$. Estos valores de Zn soluble representan un pequeño porcentaje comparándolos con el Zn total medio encontrado en suelos.

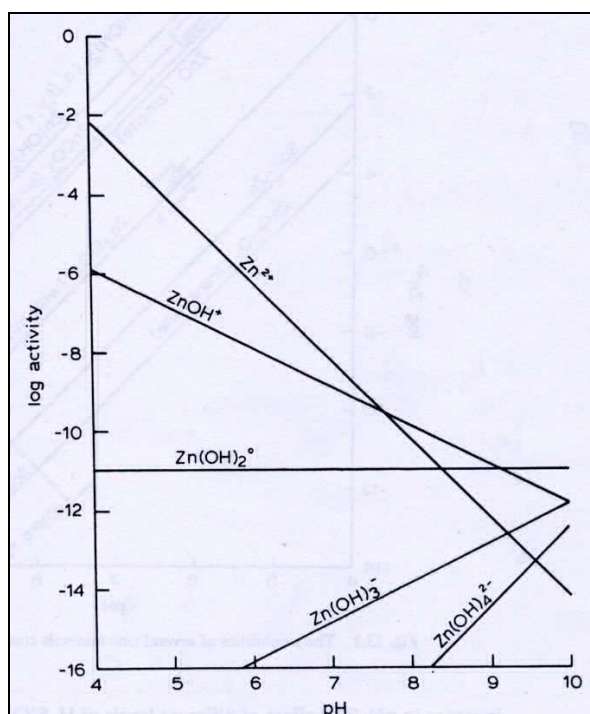
3-1-1.- Distribución del zinc en el suelo y métodos de análisis

Los factores que afectan la solubilidad y disponibilidad de zinc en suelos están ampliamente estudiados (Iyengar et al., 1981; Sims, 1986; Graham et al., 1992; Alloway, 1995). Entre los factores del suelo que más afectan esta disponibilidad del elemento para los cultivos tenemos: el contenido total de zinc, el pH, el contenido de materia orgánica, la capacidad de intercambio, la actividad microbiana y la humedad. Otros factores como la climatología y/o la cantidad de

macro y micronutrientes presentes, también podrían afectar a esta disponibilidad.

En general, los más importantes se pueden resumir en los siguientes puntos:

1.- En algunos suelos ácidos pueden aparecer niveles bajos de zinc total, pero en general la disponibilidad de zinc decrece al aumentar el pH del suelo. Esto se debe a la menor solubilidad de los minerales de Zn (**Gráfica I-2**) y al incremento de la adsorción del metal en los coloides negativos del suelo.



Gráfica I-2. Especies del Zn en equilibrio con el Zn del suelo en función del pH (Lindsay, 1979)

2.- En suelos con altos contenidos de materia orgánica la disponibilidad de zinc aumenta. Esto se puede deber a que cuando la materia orgánica se mineraliza se forman complejos solubles con el Zn que aumentan la disponibilidad del elemento.

3.- Temperaturas bajas y altas intensidades lumínicas pueden afectar el crecimiento radicular, que a su vez puede afectar la absorción de zinc por las plantas.

4.- Altos niveles de fósforo en el suelo disminuyen la disponibilidad de Zn. El antagonismo zinc-fósforo es uno de los índices más conocidos en la química del suelo y está basado en reacciones entre ambos elementos en la rizosfera (Olsen, 1991).

5.- Las interacciones del zinc con otros elementos como el hierro, el cobre o el nitrógeno también podrían afectar a la disponibilidad del mismo.

Estos factores pueden influir en que el zinc se distribuya de diferente forma en el suelo (Alloway, 2004). Viets (1962) distinguió 5 fracciones diferentes donde el elemento puede disponerse en el suelo.

- La fracción de Zn soluble (presente en la disolución del suelo)
- La fracción de Zn intercambiable (el elemento se encuentra unido a partículas del suelo por cargas eléctricas)
- La fracción de Zn unido a la Materia Orgánica (MO) (elemento adsorbido, quelado o complejoado por componentes orgánicos del suelo)
- Fracción no intercambiable (elemento adsorbido a minerales de arcilla u óxidos metálicos insolubles)
- Fracción constituida por el elemento incorporado a los minerales primarios del suelo.

El zinc solo está disponible para las plantas en las fracciones en las que el elemento se encuentra soluble en la disolución del suelo o en una fracción del mismo donde se intercambie fácilmente. De ahí el interés de conocer las cantidades de elemento que quedan en cada fracción del suelo estudiado.

La disponibilidad del zinc por las plantas, generalmente, se evalúa mediante la extracción de una fracción del zinc total mediante reactivos químicos (Kiekens, 1995). Algunos de estos reactivos se utilizan para la extracción selectiva del Zn en el suelo, mientras que otros se pueden usar para la extracción de varios elementos en el mismo. La selección de un reactivo se realiza siguiendo criterios empíricos y teóricos. A menudo el valor de zinc obtenido en los extractos es correlacionado con la cantidad de zinc extraído por una planta en el mismo terreno para comprobar la eficiencia del método (Kiekens y Camerlynck, 1982).

Debido a que los resultados analíticos se pueden ver influenciados por factores como: la interacción suelo/solución del suelo, tiempo de extracción, propiedades del suelo, matriz de zinc presente en el suelo, etc., existen diferentes reactivos para la extracción de zinc en suelo propuestas por otros tantos autores (Cottenie y Verloo, 1988) (**Tabla I-5**).

Tabla I-5. Reactivos para extracción de Zn (y otros metales) en suelo

<i>Reactivo extractante</i>	<i>Autor/es</i>
0,005 M DTPA + 0,01 M CaCl ₂ + 0,1 TEA; pH 7,30	Lindsay y Norvell (1978)
1 M NH ₄ HCO ₃ + 0,005 M DTPA; pH 7,6	Soltanpour y Schwab (1977)
0,1 M HCl	Viets y col., (1954)
2 N MgCl ₂	Stewart y Berger (1965)
(NH ₄) ₂ CO ₃ + EDTA	Trierweiler y Lindsay (1969)
0,1 M NaNO ₃	Häini y Gupta (1983)
0,05 M CaCl ₂	Sauerbeck y Styperek (1985)
0,5 M HNO ₃	Cottenie y col., (1982)
0,5 N Acetato Sódico + DTPA; pH 4,8	Wolf (1982)

3-2.- El zinc en las plantas

Históricamente, el requerimiento biológico del Zn fue descubierto por Raulin en 1869. La esencialidad del Zn en plantas se observó por primera vez en maíz (Mazé, 1915), seguido por cebada y girasol (Sommer y Lipman, 1926). Desde 1932, las deficiencias de Zn se han ido detectando en distintos cultivos hasta ser una de las carencias más importante en las producciones agrícolas mundiales (Brown y col., 1993). Se cree que el Zn es absorbido por la planta, principalmente como Zn²⁺ a través de las raíces mediante una proteína de membrana con gran afinidad por este ión, si bien no existe un acuerdo general en cuanto si la absorción es a través de canales iónicos o a través de proteínas de membrana (Grotz y col., 1998). Kochian (1993) propuso que el transporte de Zn a través de la membrana plasmática es un transporte termodinámicamente pasivo. Por otro lado, algunos autores como Eide (2005) han identificado un grupo de proteínas responsables de la absorción de Zn en células vegetales: las proteínas denominadas ZIP.

Marschner (1995) indicó que las funciones metabólicas del Zn se basan en la tendencia de este elemento a formar complejos tetraédricos con ligandos de N, O y particularmente S. Estos ligandos intervienen en actividades catalíticas y estructurales de las reacciones enzimáticas. Se estima que el Zn forma parte de aproximadamente 70 metaloenzimas estando presente en los seis grupos de enzimas: oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, lisasas, isomerasas y ligasas (Barak y Helmke, 1993). El Zn, ya sea formando parte de enzimas o en otras formas, participa directa o indirectamente en las siguientes funciones fisiológicas dentro de las plantas:

- Metabolismo de Carbohidratos
- Metabolismo de Proteínas
- Integridad de las membranas
- Metabolismo de la Auxina
- Reproducción

3-2-1.- Indicadores de la deficiencia de zinc en plantas

Se han asociado algunos síntomas visuales con la deficiencia de Zn en los cultivos (**Imágenes I-1 y 2**). Estos síntomas suelen apreciarse de manera distinta dependiendo del grado de deficiencia y del cultivo donde se presentan. El problema reside cuando estos síntomas se confunden con otros producidos por la deficiencia de algún otro nutriente, como el hierro.



Imagen I-1 a,b. Síntomas de clorosis en hojas de Algodón y necrosis en hoja de Colza (Alloway, 2004).



Imagen I-2 a,b. Bronceado en soja y reducción del espacio internodal en manzano (Alloway, 2004).

El contenido óptimo de zinc en peso seco de hojas maduras puede variar de 15 a 50 mg kg⁻¹ dependiendo de la planta analizada (Jones Jr. y col., 1991). La diferencia en el nivel crítico de zinc en hoja se debe a las diferentes sensibilidades que presentan las plantas a la deficiencia de este elemento incluso en variedades de la misma especie (Marschner, 1995).

Tabla I-6. Nivel crítico de Zn en algunos cultivos. Parte de la planta donde se analizó el Zn y el período en el que se realizó el muestreo (Jones Jr y col., 1991).

Especie (<i>Variedad</i>)	Nivel crítico Zn (mg kg ⁻¹)	Parte analizada	Período de muestreo
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	18	Última hoja desarrollada	37-56 días después de plantación
Fresa (<i>Fragaria sp.</i>)	20	Última hoja desarrollada	En Floración
Judía (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	20	Última hoja desarrollada	Desarrollo hojas trifoliales
Limonero (<i>Citrus limon</i>)	20	Hoja de rama no fructífera	5-7 meses
Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	20	Parte aérea	3,5 cm de tallo
Manzano (<i>Malus sp.</i>)	20	Hojas parte media	Mitad del desarrollo
Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	25	Hojas del fruto	5-7 meses
Olivo (<i>Olea europaea</i>)	25	Hojas parte media	No especificado
Patata (<i>Solanum tuberosum</i>)	45	Última hoja desarrollada	30 cm tallo
Soja (<i>Glycine max</i>)	21	Última hoja desarrollada	Antes de desarrollar vaina
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	20	Hoja racimo posterior	Primer racimo en floración
Trigo Invierno (<i>Triticum aestivum</i>)	21	Últimas dos hojas	Espigado
Trigo Primavera (<i>Triticum aestivum</i>)	15	Parte aérea	Espigado
Vid (<i>Vitis vinifera</i>)	25	Hoja racimo posterior	Junio-Julio

Al utilizar los datos presentados en la **Tabla I-6** como valores de referencia de zinc es importante recordar la importancia de la parte de planta muestreada, así como el momento del análisis. Si el análisis se realiza en otra parte de la planta o en otro momento del ciclo de cultivo es posible que los valores de referencia presentados no sean válidos como indicadores del estatus nutricional del cultivo (Jones Jr. y col., 1991).

3-2-2.- Deficiencia de zinc en trigo y maíz

La deficiencia de Zn en trigo reduce las cosechas y la calidad del grano recolectado. Los síntomas de deficiencia se aprecian en un principio en hojas jóvenes, ya que el elemento es poco móvil en condiciones de deficiencia. Cuando la deficiencia es poco severa aparecen manchas cloróticas en ambos lados de las hojas. Cuando la deficiencia es más severa aparecen manchas necróticas y las hojas más bajas de la planta empiezan a sufrir un descenso de tamaño (ILZRO, 1975). Las hojas reducen su crecimiento, apareciendo clorosis intervenla y necrosis en la punta de las hojas. La deficiencia de Zn en campos de trigo se suele distribuir de manera irregular y suele desarrollarse rápidamente, aunque depende del grado de deficiencia.



Imagen I-3. Síntomas de clorosis en plantas de trigo (Alloway, 2004).

Tradicionalmente la deficiencia de Zn en cultivos de trigo se trata con la adición de una sal inorgánica, el ZnSO_4 en cantidades que varían globalmente: en Australia se aplican de 0,6 a 3,9 kg de Zn ha^{-1} ; mientras que en la India se recomiendan adiciones de 25 a 50 kg de Zn ha^{-1} (Nicholson y col., 2003).

Los síntomas de deficiencia de Zn en maíz se manifiestan mediante un rayado amarillento en las hojas. Además, zonas de la hoja cercanas al tallo suelen tornar de verde a un color amarillo claro. En casos donde la deficiencia es severa, las plantas presentan un aspecto marchito debido a la reducción del espacio internodal producido por la deficiencia de elemento (también conocido como “rosetting”). Los mayores síntomas de deficiencia se observan en la parte baja de la planta debido a la poca movilidad del Zn en condiciones de carencia.



Imagen I-4. Síntomas de clorosis en plantas de maíz (Alloway, 2004).

En cosechas de maíz donde la deficiencia de Zn se observa en un estado inicial, suelen aplicarse cantidades cercanas a 25 kg de $\text{ZnSO}_4 \text{ ha}^{-1}$. En Estados Unidos de América y otros países donde la agricultura es más intensiva, las adicciones de ZnSO_4 pueden aumentar hasta los 34 kg ha^{-1} (Martens y Westerman, 1991).

4.- Correctores deficiencia de zinc

Como se ha comentado en el apartado anterior, tradicionalmente, la deficiencia de zinc en los cultivos se mitiga con la aplicación de sales inorgánicas, como por ejemplo el ZnSO_4 (Nayyar y Takkar, 1980). El problema que presenta la adición de estas sales es que en zonas alcalinas pueden perder efectividad como fertilizantes de zinc debido a que se pueden fijar en el suelo formando sales insolubles (Arce y col., 1992). Los quelatos sintéticos, generalmente, presentan la mejor eficiencia como fertilizantes para los cultivos, si bien son productos caros solo aplicables en cultivos de alto valor añadido donde los márgenes en los gastos de la explotación son mayores (Lucena, 2006). Además de esto, y debido a su gran estabilidad, estos productos pueden permanecer durante largos períodos de tiempo donde son aplicados, por lo que el riesgo de que sean lixiviados a horizontes inferiores del suelo es mayor (Modaish, 1990; Álvarez y col., 1996).

Una apropiada aplicación de los correctores de la deficiencia de zinc no solo debe corregir este defecto nutricional, sino evitar que el producto aplicado aumente los niveles de metales pesados que podrían dañar la salud pública (Hough y col., 2004). Una alternativa a las sales inorgánicas y a los quelatos sintéticos de zinc podrían ser los complejos naturales. Estos complejos naturales son sustancias, generalmente, obtenidas como subproductos en diferentes industrias con la capacidad de complejar metales en su estructura (Alkanani y MacKenzie, 1996). Además de ser moléculas más económicas que los quelatos sintéticos, al formar un complejo más débil con el metal presentan menos riesgo de contaminación (Joyce y col., 1988).

4-1.- Agentes complejantes de microelementos

Al igual que los quelatos sintéticos, los complejos son moléculas formadas por un ión metálico que es un aceptor de electrones y por una sustancia orgánica capaz de compartir los electrones con el metal. Mientras que en la terminología química un quelato es un tipo de complejo en el que la sustancia orgánica comparte dos o más pares de electrones, en la terminología agrícola, la diferencia entre quelatos y complejos está basada en la fortaleza del enlace (CE nº 2003/2003). En dicho Reglamento, se definen los productos autorizados como agentes quelantes para su utilización en suelo, pero se deja la lista de agentes complejantes pendiente de elaboración. Los agentes complejantes que se permiten utilizar como correctores de carencias de micronutrientes en fertirrigación y aplicación foliar (Real Decreto, 824/2005) son: ácidos húmicos y fúlvicos, ácidos glucónicos, aminoácidos, ácido cítrico y lignosulfonatos. A continuación se hace una breve descripción de cada uno de ellos.

Ácidos Húmicos y Fúlvicos (AHF): La Sociedad Internacional de las Substancias Húmicas (IHSS) define a los ácidos húmicos y fúlvicos, como sustancias húmicas del suelo extraídas de la materia orgánica del mismo mediante una base fuerte. Aunque estructuralmente las sustancias húmicas dependen del origen y transformaciones de la materia orgánica de la que provienen, algunos autores como Havelcová y col. (2009) indican que en la estructura general de estas sustancias predominan las cadenas aromáticas con grupos hidroxilos, fenólicos, carboxílicos junto con grupos nitrogenados y azufrados.

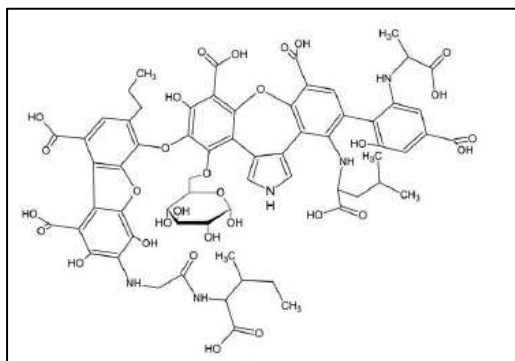


Figura I-2. Modelo aproximado de una molécula de ácido húmico (Albers y col., 2008)

Los ácidos húmicos y fúlvicos han atraído la atención de numerosos investigadores; que han investigado la aplicación de estas sustancias en procesos agrícolas, industriales, ambientales y de biomedicina (Peña-Méndez y col., 2005). En agricultura los ácidos húmicos y fúlvicos se han usado: como aditivos en fertilizantes (Arancon y col., 2004); para incrementar la fertilidad de un suelo (Buckau y col., 2000); etc. Dentro de la agricultura, una de las propiedades más importantes de estos compuestos es su capacidad para integrar hierro en su estructura facilitando la disponibilidad del micronutriente para los cultivos (Peña-Méndez y col., 2005).

Ácido Glucónico (AG): El ácido glucónico se produce a partir de una oxidación de una molécula de glucosa catalizada por una enzima glucosa oxidasa. Es un ácido orgánico débil que no es tóxico, volátil ni corrosivo. Además de ser un aditivo alimentario (E 574) permitido por la unión Europea (95/2/EC); sus grupos funcionales carboxílicos le confieren capacidad para complejar cationes en su estructura a pHs alcalinos (Ramachandran y col., 2006).

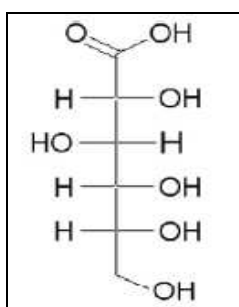


Figura I-3. Fórmula del ácido glucónico (Ramachandran y col., 2006)

Aminoácidos (AA): Los aminoácidos son las unidades estructurales fundamentales de las proteínas. Son moléculas que contienen al menos, un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino (-NH₂) libre en su estructura.

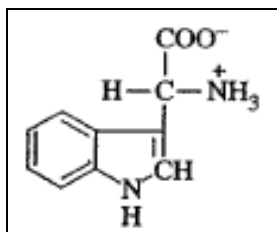


Figura I-4. Ejemplo estructural de un aminoácido: el triptófano (Stadtman y Levine, 2003)

Los aminoácidos están presentes en residuos industriales, como es el caso de las melazas generadas en industrias azucareras o los residuos de animales de la industria ganadera (Villén, 2007). Actualmente existen cuatro métodos de producción de aminoácidos: extracción, síntesis, fermentación y catálisis enzimática (Leuchtenberger y col., 2005). A estos compuestos se les atribuyen distintas funciones en la planta como la de mejorar los mecanismos de defensa de los cultivos frente a condiciones adversas (Breteler y Arnozis, 1985) y/o poseer capacidad complejante de metales (Ashmead y Samford, 2008).

Ácido Cítrico (AC): El ácido cítrico se obtiene industrialmente en la fermentación de la sacarosa por una bacteria denominada *Aspergillus niger*. Según Singh y Kumar, (2007) el ácido glucónico es un ácido poli-hidroxycarboxílico que se encuentra de forma natural en humanos y otros organismos, del cual existe una amplia demanda en sectores de construcción, químico y farmacéutico.

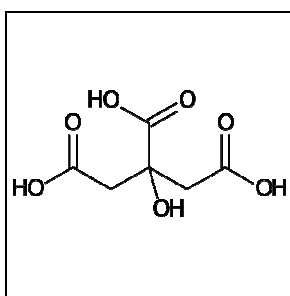


Figura I-5. Molécula de ácido cítrico.

Además de tener tales en condiciones básicas de pH (Singh y Kumar, 2007). Esto también ha sido observado en algunas especies vegetales capaces de excretar ácido cítrico al medio para complejar metales y precipitar citrato cálcico (Dindelaker y col., 1989).

Lignosulfonatos (LS): Los Lignosulfonatos (LS) son polielectrolitos aniónicos que se obtienen, principalmente, como subproductos en la separación de la celulosa y la lignina en la madera. La lignina es uno de los materiales naturales más abundantes de la tierra (Gosselink y col. 2004).

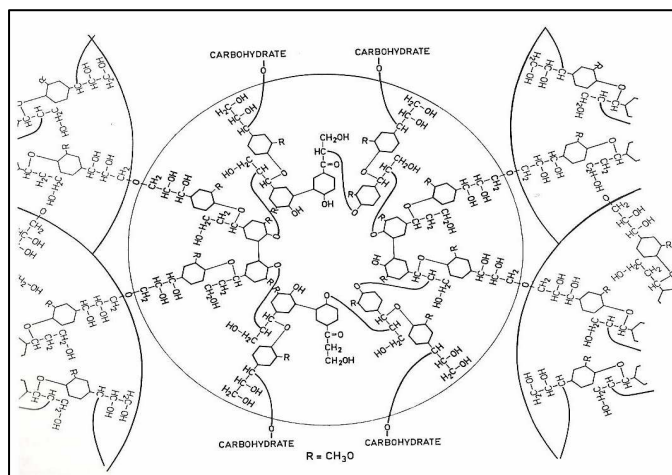


Figura I-6. Modelo de la estructura aproximada de la lignina (Smook, 2002)

Aunque la estructura exacta de los lignosulfonatos no se conoce, si se sabe que en su estructura, derivada de la lignina, aparecen una amplia variedad de grupos funcionales entre ellos: grupos alifáticos, aromáticos, sulfónicos, carboxílicos e hidroxílicos (Ma y Pawlik, 2007).

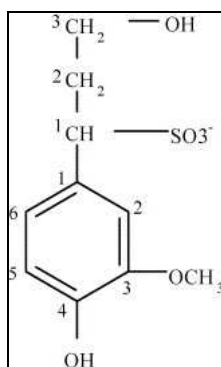


Figura I-7. Ejemplo unidad estructural típica de Lignosulfonato (Ouyang y col., 2006)

4-1-1.- Legislación

La utilización de los complejos de micronutrientes en la agricultura está regulada por el Reglamento (CE) 2003/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, a fecha de 13 de Octubre de 2003, relativo a los abonos determinó la denominación de “abonos CE”. Según este reglamento un “abono CE” es, solamente el abono que en condiciones normales de uso no produce efectos perjudiciales para la salud humana, animal o vegetal, ni sobre el medio ambiente; aporta elementos fertilizantes eficaces y ofrece métodos pertinentes de toma de muestras, de análisis y, en su caso, de ensayo.

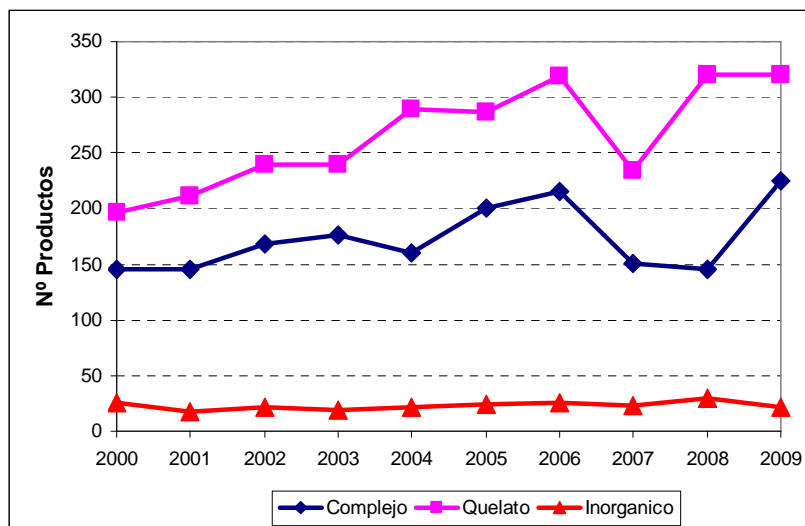
La Unión Europea simplifica la legislación comunitaria relativa a la armonización de la legislación de los Estados miembros en el ámbito de los abonos y agrupa en un único Reglamento todas las directivas que constituían hasta ahora la legislación sobre este tema. El objetivo consiste en garantizar la libre circulación de estos productos dentro de la Unión Europea. El Reglamento recoge varias disposiciones de las antiguas directivas e introduce algunas nuevas disposiciones. El elemento más importante es el cambio de instrumento jurídico, es decir, el paso de

directivas a un Reglamento, encaminado a garantizar la aplicación uniforme en la Comunidad Europea. Este Reglamento lleva a cabo una refundición de las dieciocho directivas (4 directivas básicas y 14 directivas que las modifican) publicadas entre 1976 y 1998. El Reglamento 2003/2003, desde su entrada en vigor se ha modificado en cuatro ocasiones: Reglamento (CE) 885/2004; Reglamento (CE) 2076/2004; Reglamento (CE) 1791/2006 y Reglamento (CE) 162/2007; aunque no ha sufrido grandes variaciones en sus puntos fundamentales. En este reglamento se encuentran las siguientes definiciones a tener en cuenta:

- 1) abono o fertilizante es el material cuya función principal es proporcionar elementos nutrientes a las plantas.
- 2) micronutrientes serán los elementos boro, cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc, esenciales para el crecimiento de las plantas, aunque en pequeñas cantidades si se compara con los elementos principales o secundarios.
- 3) micronutriente complejo será el micronutriente ligado a una de las moléculas que figuran en la lista del punto E.3.2 del ANEXO I (lista pendiente de elaboración).

4-1-2.- Mercado español de complejos de zinc

El número de productos correctores de carencia de microelementos ha aumentado significativamente en el mercado de fertilizantes español en el período comprendido entre el año 2000 y el 2009 (Liñán, 2000-2009). Para comprobar esto, se pueden tomar como ejemplo las formulaciones de zinc disponibles en el mercado español en este período de tiempo (**Gráfica I-3**).

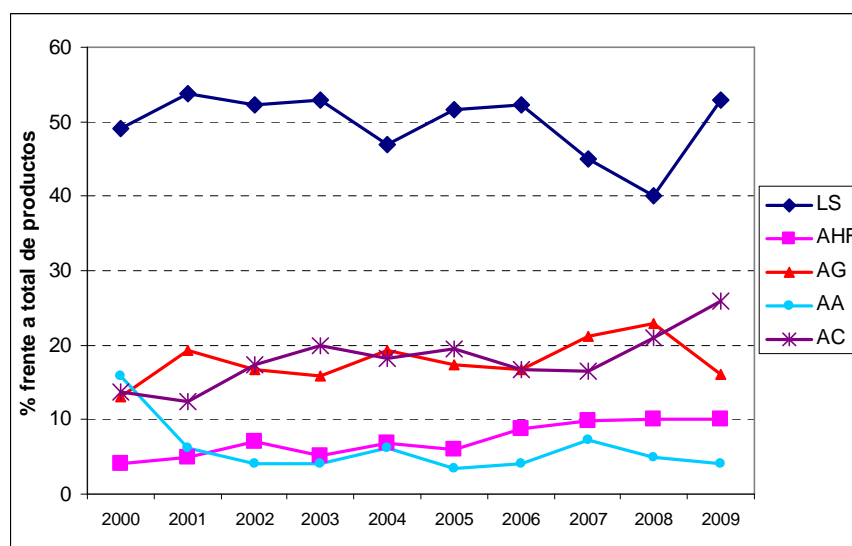


Gráfica I-3. Evolución del número de productos correctores de carencia de Zn en el mercado español. Complejos, Quelatos, Inorgánicos (Liñán, 2000-2006).

En la **Gráfica** anterior se puede comprobar el aumento en el número de productos complejos y quelatos de Zn comercializadas en el mercado español. No ocurre lo mismo con las sales inorgánicas del elemento, cuyo número de productos se mantiene constante, siendo además muy reducido en comparación con complejos y quelatos. Esta tendencia en el mercado puede tener relación con el hecho de que estudios científicos indican que las fuentes orgánicas de zinc suelen ser más

efectivas que las fuentes inorgánicas, principalmente en terrenos alcalinos (Hegert y col., 1984; Mortvedt y Gilkes, 1993).

Dentro del mercado español de complejos de Zn, la **Gráfica I-4** nos muestra la evolución del porcentaje de los diferentes agentes complejantes englobados en este grupo desde el año 2000 hasta 2009. Lignosulfonatos (LS), Ácidos Húmicos y Fúlvicos (AHF), Ácido Glucónico (AG), Aminoácidos (AA) y Ácido Cítrico.



Gráfica I-4. Evolución del porcentaje de productos complejos de Zn en el mercado español en función del agente complejante utilizado (Liñán, 2000-2006).

Entre los años 2000 y 2009, aproximadamente el 50% de los productos complejantes de Zn de los que se dispone en el mercado están en forma de lignosulfonato. La proliferación de estos productos en el mercado se debe, entre otras razones, a la alta capacidad para complejar zinc presentada frente a otros complejos como por ejemplo los aminoácidos (Villén y col., 2007).

Por otro lado, los productos de zinc complejados por ácido cítrico y ácidos glucónicos se mantienen en un 20% mientras que los ácidos húmicos y fúlvicos así como los aminoácidos suponen un porcentaje de entre un 5 y un 10% del total de productos complejos de zinc presentes.

4-2.- Lignosulfonatos

Como se ha indicado en el Apartado 4-1 los lignosulfonatos son subproductos industriales generados, principalmente, en la industria papelera. La obtención de pastas de papel o de celulosa noble se lleva a cabo por solubilización de la lignina; lo que, a su vez, implica una disolución parcial de la celulosa (Vián, 1976). En función de la manera por la cual se separe la celulosa de la lignina podemos distinguir entre: métodos mecánicos y químicos. En el pulpeo mecánico, las fibras de la madera son separadas mediante energía mecánica. Las principales técnicas de pulpeo mecánico son: “Stone Groundwood Pulping” (SGW), “Pressure Groundwood Pulping” (PGW) y “Thermo-Mechanical Pulping” (TMP). Por otro lado, las reacciones de separación química se pueden dividir en dos categorías: método al sulfito y método al sulfato. Los lignosulfonatos son subproductos producidos en el método al sulfito; mientras que la llamada lignina Kraft se obtiene como subproducto cuando se utiliza el método al sulfato.

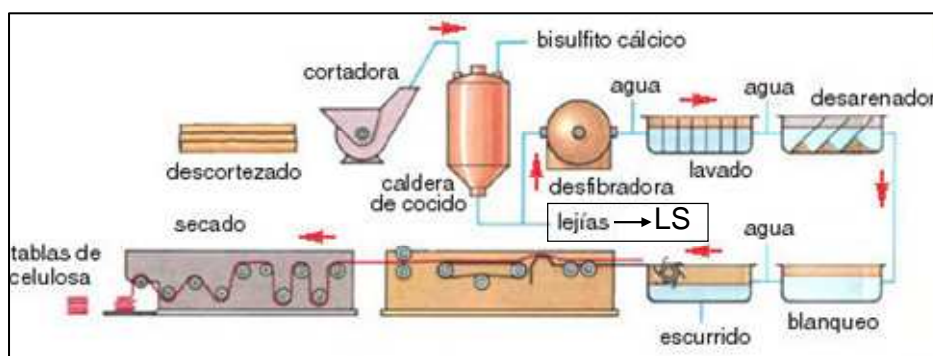


Figura I-8. Esquema proceso de obtención de celulosa a partir de madera por el método al sulfito.

La lignina Kraft, es un subproducto que tiene una larga cadena de moléculas aromáticas dispuestas al azar polimerizadas (Cavdar y col., 2008). Las diferencias principales entre lignina Kraft y lignosulfonato reside en que los lignosulfonatos suelen tener pesos moleculares mayores y grupos sulfónicos en su estructura (Ekeberg y col., 2006). Estos grupos sulfónicos dotan al lignosulfonato de una elevada solubilidad en agua, característica que no posee su material de origen: la lignina (Shen y col., 2008). El lignosulfonato es un poli-anión rico en grupos sulfónicos en con una estructura variable (Shen y col., 2008). Dependiendo de la procedencia o proceso industrial al que sean sometidos, los lignosulfonatos pueden presentar en su estructura diferente cantidad de grupos funcionales hidrofílicos: fenoles, hidroxilos,... y grupos hidrofóbicos: cadenas carbonadas... (Telysheva y col., 2001). Esta variedad estructural hace que sus propiedades físico-químicas varíen. Para determinar la disposición de grupos funcionales en los lignosulfonatos se aplican técnicas espectroscópicas, FTIR; ^1H -RMN y/o cromatográficas con geles permeados (CGP).

Hasta ahora, solo el 2% de la lignina extraída en la industria del papel se comercializa industrialmente; principalmente en forma de lignosulfonato, con montantes anuales de un millón de toneladas (Gargulak y Lebo, 2000). Un ejemplo de esto se observa en Estados Unidos de América donde en los años 90 se estimaron producciones de lignosulfonato de unas 300000 Tm año⁻¹, de las cuales a solo un 18% se les dio utilidad comercial (Canselier, 2008). Del proceso de pulpeo en la obtención de pasta de papel se obtienen numerosos residuos de la lignina utilizados en diferentes procesos industriales.

Industrialmente, los lignosulfonatos se usan como aglomerantes, secantes, dispersante de aguas residuales en la industria del carbón (llamados CWS, “coal water slurry”), como aglomerantes en alimentos animales y en agricultura (Yang y col., 2007) (**Tabla I-7**).

Tabla I-7. Distribución de los principales usos de los lignosulfonatos (Knaggs y Nepras, 1997).

<i>Usos</i>	<i>Distribución Consumo (%)</i>
<i>Aglomerante asfalto</i>	19
<i>Aglomerante comida animal</i>	15
<i>Aditivo</i>	14
<i>Dispersante aguas residuales</i>	4
<i>Dispersante Plaguicidas</i>	3
<i>Otros</i>	45

4-2-1.- Uso agrícola de los lignosulfonatos

A pesar de no ser las aplicaciones mayoritarias (**Tabla I-7**); de las numerosas aplicaciones de los lignosulfonatos y debido al objetivo de este trabajo, a continuación se explican con más detenimiento las aplicaciones de estos productos en el sector agrícola.

Las moléculas de lignosulfonato disueltas suelen distribuirse en forma esférica y con carga negativa (Xie y col., 1994). Esta característica otorga a las moléculas de lignosulfonato la capacidad de complejar metales en su estructura, adsorberse en ciertas superficies y participar de manera activa en algunas reacciones que se dan lugar en suelos agrícolas (Meier y col., 1993). Esta disposición estructural, junto con el origen orgánico de los lignosulfonatos, hace que cuando han sido aplicados a suelos salinos y erosionados se haya observado una mejora en las propiedades físicas, químicas y biológicas, así como una reducción en las pérdidas de agua por evaporación en estos suelos (Buylov y col., 1979; Callebaut y col., 1979).

También se ha observado que los lignosulfonatos han aumentado el crecimiento radicular en cultivos “in vitro” de ciertas especies vegetales (Doquier y col., 2007). Van der Krieken y col., (1997) sugiere que este crecimiento se debe a que el lignosulfonato actúa incrementando la sensibilidad de los tejidos de la planta a la auxina. Otro efecto beneficioso, observado en aplicaciones de lignosulfonatos a nivel radicular, fue el de aumentar las interacciones entre las raíces de pino silvestre y el hongo *Pisolithus tinctorius* para fomentar la simbiosis entre ambos,

aumentando así la toma de nutrientes por la planta (Niemi y col., 2005). Los lignosulfonatos, también han sido utilizados de manera eficiente como bactericidas. Soltani y col., (2002) observaron que la aplicación de $\text{NH}_4\text{-LS}$ en cultivos de patata, redujo la población de *Strptomyces* spp. (Escarabajo de la patata) en un 50-80%. Esta reducción fue asociada al incremento de la actividad microbiana del suelo que pudo producir un efecto de control biológico sobre la plaga. Por otro lado, otros autores (Abbasi y col., 2002) observaron que aplicaciones foliares de $\text{NH}_4\text{-LS}$ en cultivos de tomate y pimiento reducían la infección de las plantas por el patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Además de estas aplicaciones, los lignosulfonatos también se emplean agronómicamente como correctores de carencias de micronutrientes. Esto es debido a la capacidad que presentan estas moléculas para complejar estos elementos en su estructura aumentando así su disponibilidad en para las plantas (Alkanani y MacKenzie, 1996; Cihacek, 1984).

4-2-2.- Lignosulfonato de zinc

Los complejos de micronutrientes (entre ellos el ZnLS) son menos estables que los quelatos sintéticos por lo que suelen aplicarse en la hoja de las plantas o incorporados en disoluciones nutritivas (Lucena, 2003). A pesar de esto existen numerosos trabajos donde se evalúa la eficiencia de estos productos como correctores de carencias de Zn en forma sólida y líquida en suelos agrícolas. Una aplicación del ZnLS podría ser su adición como fertilizante de Zn en suelos alcalinos y/o con exceso de cal donde la deficiencia de Zn es un problema extendido

(Khoshgoftarmanesh y col., 2004). Tradicionalmente, en estos suelos la deficiencia de Zn se corrige con la adición de ZnSO_4 y otras sales inorgánicas (Nayyar y Takkar, 1980) aunque dicha incorporación suele provocar la inmovilización del Zn y su disminución en la disolución del suelo (Arce y col., 1992).

En forma sólida, Goos y col., (2000) compararon la eficacia como fertilizante de una mezcla entre lignosulfonato y humato de Zn (ZnHL) frente a una forma inorgánica (ZnSO_4) y un quelato sintético (ZnEDTA) del metal, para plantas de maíz cultivadas en un suelo calcáreo. Los resultados obtenidos por los autores revelaron que la mejor fuente (mayores pesos secos y concentraciones de Zn en planta) de Zn para el cultivo fue el ZnEDTA; si bien el producto ZnHL resultó más eficiente que el ZnSO_4 cuando los productos fueron aplicados en forma granulada. Gangloff y col., (2002), obtuvieron resultados similares cuando presentaron un ensayo en el cual se comparaban ZnEDTA, ZnLS y ZnSO_4 como fuentes de Zn para maíz en un suelo, esta vez, con $\text{pH}=7,2$. De nuevo los autores encontraron evidencias de que la fuente de Zn que más eficiente fue el ZnEDTA. En esta ocasión, aunque las plantas fertilizadas con ZnLS presentaron más peso seco, que las tratadas con ZnSO_4 ; las diferencias no fueron significativas, por lo que suponemos que el pH neutro del suelo pudo influir en este hecho. Slaton y col., (2005) aplicaron productos de Zn con diferentes solubilidades en agua (ZnLS, óxidos de Zn y ZnSO_4) en un cultivo de arroz en 4 suelos con pHs cercanos a 7,5. Los autores indicaron que cuando el nivel de Zn soluble del fertilizante aplicado disminuyó del 40%, el crecimiento del cultivo se vio comprometido. Estos autores encontraron solubilidades en agua cercanas al 90% para el ZnSO_4 y el ZnLS y del 30% para los óxidos de Zn; por lo que se espera una menor eficiencia de estos últimos como fertilizantes.

Además de utilizar el ZnLS en forma sólida, Rico y col., (1996) aplicaron el producto en forma de recubrimiento en urea a plantas de maíz en un suelo calcáreo. Para esto presentaron una serie de trabajos que abarcan desde la preparación del fertilizante nitrogenado recubierto con varias fuentes de Zn por medio de resinas (Rico y col., 1995); el estudio del fraccionamiento del Zn que estos productos producen en un suelo calcáreo dispuesto en columnas de lixiviación (Álvarez y col., 1996) y por último la evaluación de la eficiencia de fertilizantes de urea recubiertos con ZnLS y con ZnEDTA como fuentes de Zn en plantas de maíz cultivadas en un suelo calcáreo de pH = 8,5 (Rico y col., 1996). Los resultados más relevantes obtenidos por los autores fueron que las dos fuentes de Zn empleadas en el ensayo (ZnEDTA y ZnLS) dieron respuestas positivas en cuanto a que aumentaron el crecimiento vegetativo de las plantas de maíz, si se comparan con las plantas control (sin Zn añadido). En las columnas de lixiviación observaron que cuando el Zn se aplicaba en forma de ZnEDTA el elemento se distribuyó a lo largo de la columna, mientras que si era aplicado en forma de ZnLS era retenido en la zona de aplicación del fertilizante.

Respecto a la aplicación del ZnLS en forma líquida; Álvarez y col., (2001) estudiaron el fraccionamiento y la movilidad del Zn en distintos suelos, dependiendo de la fuente en la que es aplicado. Estos autores estudiaron la distribución del Zn y su eficiencia como fertilizante para plantas de maíz en diferentes productos (quelatos sintéticos y complejos de Zn) en función de que el suelo donde se aplican tenga carácter: ácido (López-Valdivia y col., 2002), calcáreo (Álvarez y Rico, 2003) o neutro (Álvarez y González, 2006). Así, en suelos ácidos, el ZnLS aumentó la concentración de Zn de las plantas tratadas frente a productos

como ZnEDDHA, Zn-fenolato, Zn-poliflavonoide y Zn-gluconato. En suelos considerados neutros, el ZnLS presentó una efectividad relativa, como fertilizante de Zn, similar a la que observaron en los mismos productos. En suelos calcáreos se evaluó la eficiencia relativa de un producto Zn-aminoácidos (ZnAA) frente a una mezcla de ácidos dietilentriaminpentaacético-hidroxietilendiamintetraacético y etilendiamintetraacético (DTPA-HEDTA-EDTA), para suministrar Zn a un cultivo de maíz. Aunque el producto ZnAA aumentó la materia seca y la concentración de Zn de las plantas tratadas, estos índices fueron significativamente más bajos que los obtenidos en las plantas tratadas con la mezcla de quelatos sintéticos. Gonzalo y col., (2008) obtuvieron resultados similares cuando compararon la eficiencia como fuente de Zn para un cultivo de judía la misma mezcla de quelatos de Zn (Zn-DTPA-HEDTA-EDTA) con un producto compuesto por un aminolignosulfonato de Zn (ZnAML) en un suelo calcáreo y en otro ligeramente ácido. En el suelo calcáreo, las plantas tratadas con el producto compuesto por una mezcla de quelatos de Zn presentaron mayores pesos secos y concentraciones de Zn que las plantas tratadas con el ZnAML. Sin embargo, en suelos ligeramente ácidos, la eficiencia entre ambos productos es parecida, pero cuando se utilizó el producto Zn-DTPA-HEDTA-EDTA se produjeron pérdidas de producto por lixiviado, mientras que el producto ZnAML quedó retenido en la zona de aplicación, por lo que se evitaron pérdidas económicas y riesgo ambiental.

A pesar de que existen numerosos estudios donde se evalúa la efectividad de los lignosulfonatos de Zn como fuentes del elemento en aplicaciones a suelos (Nayyar y Takkar, 1980; Álvarez y col., 1996; Rico y col., 1996; Goos y col., 2000; Álvarez y González, 2006; Gangloff y col., 2006), la legislación Española solo permite

la adición de lignosulfonato de Zn en aplicaciones foliares o en fertirrigación (BOE, 2005). Que la aplicación de lignosulfonatos de Zn a suelos esté restringida por la legislación se puede deber, en parte, a la falta de un método analítico que permita una correcta caracterización de los mismos. Como se ha indicado anteriormente, existen trabajos donde se utilizan técnicas de infrarrojos por transformada de Fourier (Alonso y col., 2005) o de ^1H -RMN (McElroy y Lai, 1988) para caracterizar cualitativamente a los lignosulfonatos. El problema aparece cuando no existe una metodología cuantitativa que indique la cantidad de elemento que se compleja en estas moléculas. Esto puede ser debido, principalmente, a la complejidad estructural de los materiales de donde proceden y de los procesos industriales que sufren los mismos.

Villén y col., (2007) realizaron una aproximación, desarrollando un método de análisis para complejantes de metales. Esta aproximación consistió en aplicar una variación de un método de la "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC) basado en la precipitación de las formas insolubles del Zn a pHs alcalinos. Este método supone un avance en la caracterización de agentes complejantes, ya que la aplicación del mismo aporta información sobre la capacidad para complejar metales de las moléculas estudiadas.

Por otro lado, los lignosulfonatos de Zn pueden ser aplicados a los cultivos incorporándolos en fertilizantes de macronutrientes. La incorporación de productos de Zn en abonos de macronutrientes es una práctica frecuentemente utilizada en la fabricación de fertilizantes debido a que aporta beneficios económicos (tiempo y combustible, principalmente) al aplicar macro y micronutrientes al mismo tiempo

(Jackson y col., 1962). Sin embargo en esta incorporación el zinc puede reaccionar con los componentes del abono, pudiendo disminuir la disponibilidad del oligoelemento para los cultivos. Debido a esto sería recomendable disponer de un test químico que nos diese una predicción de la eficacia del Zn como fertilizante para los cultivos cuando son incorporados en abonos de macronutrientes. En varios ensayos, Mortvedt y Giordano, (1968 y 1969) relacionaron la cantidad de Zn que se podía extraer de un fertilizante de macronutrientes al que se le había incorporado una fuente de Zn con su capacidad para suministrar Zn a un cultivo de maíz. Los autores encontraron buenas correlaciones entre el Zn extraído con DTPA (CaCl_2 ; pH = 7,3) en el fertilizante y la respuesta del maíz (en pesos y concertación de Zn en planta) a la aplicación del mismo. Además subrayaron que la efectividad del fertilizante no viene marcada por la cantidad de Zn total incorporado sino por su capacidad para mantenerse disponible para las plantas en la disolución del suelo. Este hecho ha sido corroborado posteriormente por otros autores (Amrani y col, 1999; Gangloff y col., 2002; Slaton y col., 2005).

II.- OBJETIVOS

El objetivo general planteado en este trabajo es el de evaluar la utilización del lignosulfonato de zinc (ZnLS) adherido en un fertilizante complejo mineral NPK como fuente de este elemento en cultivos de trigo y maíz. Este objetivo se puede dividir en los siguientes apartados:

Objetivo 1.- Preparación de productos ZnLS partiendo de varias sales de lignosulfonatos de distinto origen y estructura. Se elegirá el complejo ZnLS más adecuado, que se evaluará como fuente de Zn para cultivos hidropónicos de trigo y maíz comparándolo con Zn SO_4 .

Objetivo 2.- Se formulará un fertilizante de macronutrientes (NPK) con lignosulfonato de zinc integrado. El producto deberá ser suficientemente homogéneo para su empleo en ensayos biológicos.

Objetivo 3.- Se evaluará la eficacia agronómica del NPK con lignosulfonato de zinc adherido como fertilizante de este elemento vía radicular para plantas de trigo y maíz. Esta evaluación se llevará a cabo tanto en condiciones controladas sobre perlita y suelo, como en condiciones de campo.

Objetivo 4.- En función de los resultados obtenidos con los lignosulfonatos de Zn en los objetivos del 1 al 3: se formulará y evaluará un complejo de manganeso con lignosulfonatos, siguiendo la misma metodología usada con el Zn. Del mismo modo se intentará evaluar la eficacia de un producto NPK con lignosulfonato de Mn adherido, como fuente de manganeso vía radicular para plantas de trigo.

**III.- EFFICIENCY OF A ZINC LIGNOSULFONATE
AS Zn SOURCE FOR WHEAT (*Triticum aestivum*
L.) AND CORN (*Zea mays* L.) UNDER
HYDROPONIC CULTURE CONDITIONS**

1.- Abstract.....	74
2.- Introduction.....	75
3.- Materials and Methods.....	79
3-1.- Reagents.....	79
3-2.- ZnLS Complexing Capacity.....	79
3-3.- Preparation of Zn Lignosulfonates.....	80
3-4.- Biological Experiments.....	82
3-4-1.- Wheat experiment at pH 7.0.....	82
3-4-2.- Wheat experiment at pH 8.0.....	83
3-4-3.- Corn experiment at pH 8.0.....	83
3-5.- Analytical Procedures.....	84
3-6.- Statistical Analyses.....	84
4.- Results and Discussion.....	85
4-1.- ZnLS-Complexing Capacity.....	85
4-2.- Biological Experiments.....	88
4-2-1.- Wheat experiment at pH 7.0.....	88
4-2-2.- Wheat experiment at pH 8.0.....	91
4-2-3.- Corn experiment at pH 8.0.....	93
5.- Conclusions.....	94

1.- Abstract

The objective of this study was to evaluate the efficiency of a zinc lignosulfonate (ZnLS) as Zn source for wheat and corn plants under hydroponic conditions. The Zn-complexing capacity of three commercial lignosulfonates (byproducts of the paper and pulp industry) was tested, and a LS-NH₄, from spruce wood, was selected. Its efficacy as Zn fertilizer for wheat and corn plants was assessed at different pH values (7.0 and 8.0) in comparison with a chelate (ZnEDTA) and an inorganic salt (ZnSO₄). For wheat at pH 7.0, it was concluded that the efficacy of the Zn fertilizers followed the sequence Zn-EDTA > Zn-LS \approx ZnSO₄ > zero-Zn; and for wheat and corn at pH 8.0, similar results were obtained: Zn-LS > ZnSO₄ \approx 0 Zn. These data give evidence that ZnLS could be used as Zn source to the roots of wheat and corn and seems to be more efficient than ZnSO₄ to correct Zn deficiency in both plants.

2.- Introduction

Globally, 30% of cultivated soils are deficient in Zn (Kochian, 2000). This has implications for plant production and for the nutritive value of crops. Zinc is an essential component of over 300 enzymes (Hacisalihoglu and Kochian, 2003). It plays catalytic, cocatalytic, or structural roles in many plant processes (Marschner, 1995). The relatively recent discovery of widespread Zn deficiency problems in rice, wheat, and corn is linked to the intensification of farming in many developed countries (Alloway, 2004). About 50% of the soils used for cereal production in the world contain low levels of plant-available Zn, which reduces not only grain yield but also the nutritional quality of grain (Cakmak et al., 1997). Continuous use of phosphoric fertilizers and intensive cultivation of high-yield crop varieties have resulted in a widespread deficiency of Zn that has produced a decrease in the growth of many field crops in almost all soil types (Alam and Shereen, 2002).

This deficiency is traditionally corrected by application to the soil of inorganic Zn salts such as ZnSO_4 (Nayyar and Takkar, 1980). When Zn is added to calcareous soils in the form of soluble inorganic salts, it is fixed to a large extent (Arce et al., 1992). The use of synthetic chelates is the most common and efficient agricultural practice to treat metal deficiencies, but it is an expensive practice, used only in cash crops (Lucena, 2006). Moreover, when stable chelates, such as ZnEDTA, are used on alkaline soils, they can migrate through the soil profile and leach (Modaihsh, 1990; Alvarez and Rico, 1996).

Zinc lignosulfonate (ZnLS) is a complexed organic fertilizer that is formed by reacting ZnSO_4 with sulfonated lignin wastes produced by the paper and pulp industry. Although the exact structure of lignosulfonates has not been elucidated, it is generally accepted that a wide variety of functional groups are present in the lignosulfonate molecules such as aliphatic, aromatic, sulfonic, carboxylic, and hydroxyl groups. These products are commercially available as calcium, sodium, potassium, or ammonium salts (Ma and Pawlik, 2007).

In 2006, the number of Zn complexes available at the Spanish fertilizer market were 216. Within the complexes, the amount of ZnLS increased significantly from 2000 (71 products) to 2006 (113 products) (52% of the total). Nowadays, lignosulfonates are the most used agents to complex Zn at the Spanish market (De Liñan, 2000-2006).

Many claims are made regarding the relative efficiency of organic versus inorganic Zn sources. Producers of organic sources generally claim a 10:1 advantage of organic source versus inorganic source (i.e., ZnSO_4) to satisfy the agronomic demand. However, most research has found that there is approximately a 3:1 to 5:1 advantage for ZnEDTA in comparison to ZnSO_4 (Mortvedt, 1979; Hegert et al., 1984).

Complexes, such as LS, provide several advantages in comparison to other Zn fertilizers. Lignosulfonates have less risk of contamination in some environmental compartments (Joyce et al., 1988) due to their lower stability than chelates. With regard to this, Alvarez and Rico (1996) studied the relative mobility of ZnEDTA and

ZnLS added to calcareous soil columns, concluding that ZnLS remained mostly in the upper zone of the leaching columns and ZnEDTA could migrate to lower zones of the soil. Moreover, complexes are cheaper than synthetic chelates, so they can be used in a large number of crops even if they had lower efficacy than chelates (Villen et al., 2007).

High pH and CaCO_3 concentration of soils are usually referred to as the reasons for the low availability of Zn (Khoshgoftarmanesh et al., 2004; Lindsay, 1979). Moreover, Rico et al. (1996) tested the efficacy of some Zn fertilizers to provide this element to corn plants grown in calcareous soil and showed that both sources gave rise to a good response by the maize. However, the increments of yield and concentration of Zn in the plants were higher when ZnEDTA was added. On the other hand, another set of experiments was conducted under neutral pH (Gangloff et al., 2002; Alvarez and Gonzales, 2006; Gangloff et al., 2006), which supported the best effectiveness of the ZnEDTA as Zn source compared to ZnLS and ZnSO_4 .

Despite there being some studies that tested the ZnLS as a Zn source for plants roots (Nayyar and Takkar, 1980; Alvarez and Rico, 1996, Rico et al., 1996; Gangloff et al., 2002; Alvarez and Gonzalez, 2006; Gangloff et al., 2006; Loneragan et al., 1982), Spanish legislation allows the ZnLS only in foliar or fertirrigation applications (BOE, 2005). Nowadays, soil ZnLS applications are not legally accepted in Europe, partly due to the lack of an analytical method to quantify these types of products and partly because of the little evidence of their efficacy available in the literature. One approach to find an analytical method was done by Villen et al. (2007). This method is established only on the basis of the compounds metal

complexing capacity and avoided their quantification. Further research is needed at this point. On the other hand, biological data about the efficacy of metal-LS as soil fertilizers for different crops are necessary. For this purpose, hydroponical assays are required to establish the efficiency of these products to provide Zn to roots.

The aim of this work was divided in two studies. In the first, a ZnLS product was prepared from commercial LS salts and selected in order to its better characteristics to provide Zn to roots of crops. In the second one, the efficacy of ZnLS to provide Zn to wheat and corn was evaluated. For this, first an experiment with wheat at pH 7.0 was designed to test the ability of the ZnLS to supply Zn to the root system in comparison with other sources under neutral conditions. After that, another experiment was prepared under simulated calcareous conditions both with wheat and with corn.

3.- Materials and Methods

3-1.- Reagents

All reagents used to form the Zn complexes ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Panreac), to apply the AOAC modified method (Villen et al., 2007) [H_2O_2 (33%) and NaOH, Panreac], and in the nutrient solutions of biological experiments [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , NaCl, CuSO_4 , MnSO_4 , $\text{MoO}_4(\text{NH}_4)_6$, H_3BO_3 , Panreac, FeEDDHA (as Torneo, Syngenta), H_5DTPA (as Tritiplex V, Merck) and Na_2EDTA (as Tritiplex III, Merck)] were of recognized analytical grade. The water used for the preparation of reagents or standards conforms to EN ISO 3696 (ISO, 1987), grade I, free of organic contaminants.

3-2.- ZnLS-Complexing Capacity

The Zn-complexing capacity of three commercial lignosulfonates has been determined by using the method described by Villen et al. (2007). The method seeks the amount of Zn that remains in solution after pH increase; this Zn concentration was the so-called complexed Zn.

Ten grams of lignosulfonates was dissolved in type I water. The volume was made up to 200 mL. Twenty milliliters of this solution was added to 60 mL polyethylene vessels. Increasing volumes of ZnSO_4 (100 g L^{-1}) and 2 drops of H_2O_2 (33%) were added to each vessel (1.0, 1.5, 3.5, 5.0, 7.0, 12.0, 13.0, 15.0, 17.0, and 20.0 mL, respectively). After the additions, the pH was raised to 9.0 with 0.5 M

NaOH. After 30 min, pH values were readjusted to 9.0 and the polyethylene vessels were stoppered. Samples were left to stand overnight in the dark. After that, the pH was readjusted to 9.0, if necessary. Solutions were transferred to a 100 mL volumetric flask and made up to volume with type I water. If a precipitate appeared, samples were centrifuged for 10 min at 7500 min⁻¹ before being filtered through a 0.45 µm Millipore filter. Removal of the organic compounds was made in accordance with method 9.3 (EC 2003/2003 Regulation). Twenty-five milliliters of the solutions was added to a 100 mL vessel, and 5 mL of H₂O₂ (33% w/v) and 5 mL of 0.5 M HCl were added. Solutions were left to stand during 1 h and then heated for 30 min at 90 °C for the digestion of the samples. If it was required, an extra 5 mL of H₂O₂ could be added, with additional heating. Finally, solutions were made up to 50 mL volume. The Zn remaining in solution (complexed Zn) of each replicate was determined by atomic absorption spectroscopy (AAs) (AAnalyst 800, Perkin-Elmer). Three replicates per addition of Zn were done.

3-3.- Preparation of Zn lignosulfonates

Three lignosulfonates, kindly provided by Lignotech Iberica S.A., were tested in this study; two of them were from spruce wood and the other was from eucalyptus wood with different accompanying cations: spruce NH₄-LS, spruce Na-LS, and eucalyptus Na-LS. The physicochemical characteristics of the products provided by the company are described in **Table III-1**.

Table III-1. Physicochemical Characteristics of the Lignosulfonates Tested

	Lignosulfonate products		
	<i>Spruce NH₄</i>	<i>Spruce Na</i>	<i>Eucalyptus Na</i>
% LS	87.7	54.8	87.4
pH	4.4	6.0	9.5
Total S (%)	6.2	5.3	8.0
Phenolic groups (%)	1.9	2.0	1.3
Carboxylic groups (%)	2.6	6.6	5.5

On the basis of their maximum complexing capacity, 3 μM Zn as ZnLS stock solutions was prepared by introducing into a 100 mL vessel the suitable amount of LS [taking into account the percentage of LS of each formulation (**Table III-1**)] and the corresponding volume, to attain this maximum, of a 100 g L⁻¹ of ZnSO₄. After agitation of the mixture during one night in the dark, solutions were made up to volume. The final Zn concentration was assessed by AAs.

3-4.- Biological experiments

3-4-1.- Wheat experiment at pH 7.0

Wheat seeds (*Triticum aestivum* L. cv. Perico) were germinated in the dark on moist filter paper at 30 °C. After germination, seedlings were transferred to a 12 L container with a complete nutrient solution without Zn, in a greenhouse at the Autonoma University of Madrid, where climatic conditions were (day/night) temperature, 25/18 °C, and relative humidity, 50/80%. Humidity and temperature were maintained by using a fog cooling system. The composition of nutrient solution was 3.0 mM Ca(NO₃)₂, 4.0 mM KNO₃, 2.0 mM KH₂PO₄, 1.0 mM MgSO₄, and 0.5 mM NaCl with microelements 50 µM FeEDDHA (as Sequestrene), 0.5 µM CuSO₄, 5.0 µM MnSO₄, 0.5 µM MoO₂₄(NH₄)₆, and 25 µM H₃BO₃. This nutrient solution was buffered by a DTPA-excess solution (Parker et al., 1992), and the pH was kept at 7.0 ± 0.3. After 7 days, 10 seedlings were placed in 3 L pots (covered with aluminum foil), and treatments were applied: a control without adding Zn (0 Zn), 3.0 µM ZnSO₄ (sulfate), 3.0 µM ZnLS (lignosulfonate), and 3.0 µM ZnEDTA (EDTA). The nutrient solution when treatments were applied was not DTPA-excess buffered, in order to avoid competition between LS and the chelate for the nutrients. Solutions were continuously aerated with a pump and renewed weekly. Three replicates by treatment were done. After 14 days, shoots and roots were separated.

3-4-2.- Wheat experiment at pH 8.0

Wheat seeds were germinated and grown under Zn deficiency as described in the previous experiment. After 7 days, 10 seedlings were placed in 3 L pots (covered with aluminum foil), and treatments were applied (four replicates each one): a control without added Zn (0 Zn), a treatment with 3.0 μM ZnSO_4 , and one treatment with 3.0 μM ZnLS. The pH of the nutrient solution was kept at 8.0 ± 0.3 , and 0.1 g L^{-1} of solid CaCO_3 was added to simulate calcareous conditions. The nutrient solutions were aerated with a pump and renewed weekly. After 14 days, shoots and roots were separated. The experiment were done in a growth chamber, with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness with corresponding temperatures of 25 and 18 °C and relative humidity of 50 and 80%. The radiation flux was 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3-4-3.- Corn experiment at pH 8.0

An assay similar to the previous pH 8.0 wheat experiment was done with corn seeds (*Zea mays* L. cv. PR5500). The experiment included only one variation: the number of seedlings transferred to experimental pots (after Zn deficiency) was 7 instead of 10. All of the experiments were set up in a completely randomized block.

3-5.- Analytical Procedures

Shoots and roots were weighed and thoroughly washed with a Tween-HCl mixture [Tween 0.1% (v/v) and 0.1 M HCl] (Alvarez-Fernandez et al., 2005) and deionized water. After that, plant material was dried at 70 °C for at least 2 days to determine dry weight. Concentrations of Zn, Mn, Cu, and Fe in dried plant material samples were measured by AAs after mineralization of the samples at 480 °C for 4 h and dissolving ashes in 2% HCl at 80 °C for 30 min (Kaminska et al., 1983). Phosphorus was measured by a colorimetric UV-visible determination (UV-160A, Shimadzu) (Kitson and Mellon, 1944).

Concentrations of Zn, Mn, Cu, and Fe in dried wheat and corn seeds were measured by AAs after mineralization of the samples (Kaminska et al., 1983) in order to determine the initial concentration of micronutrients in these seeds (five replicates were done).

3-6.- Statistical Analyses

Differences among Zn treatments were analyzed by one-way ANOVA, followed by a post hoc multiple comparison of means using the Duncan test ($\alpha = 0.05$). The statistical analysis was performed with the statistical program SPSS 14.0.

4.- Results and Discussion

4-1.- ZnLS-Complexing Capacity

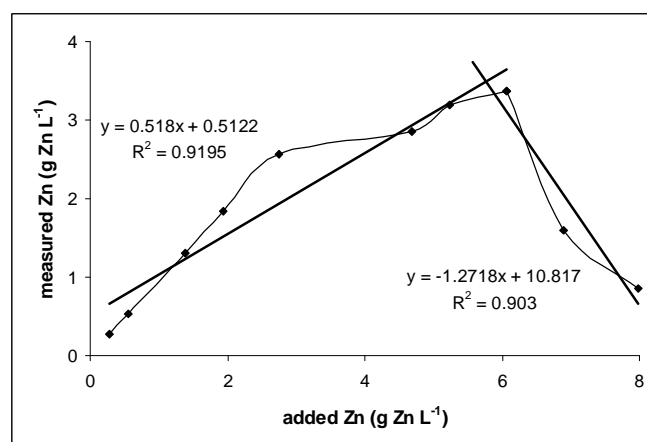


Fig. III-1a)

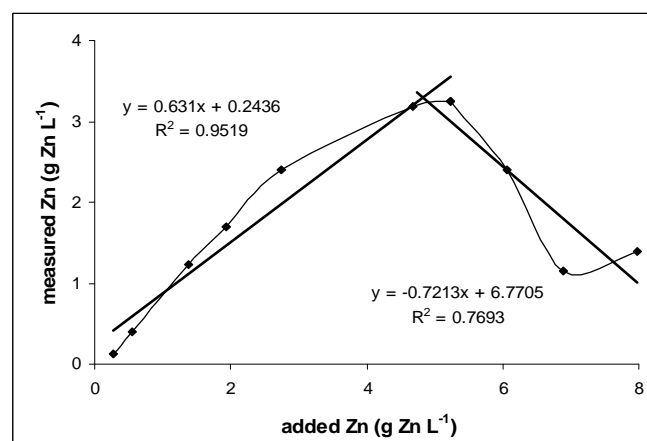


Fig. III-1b)

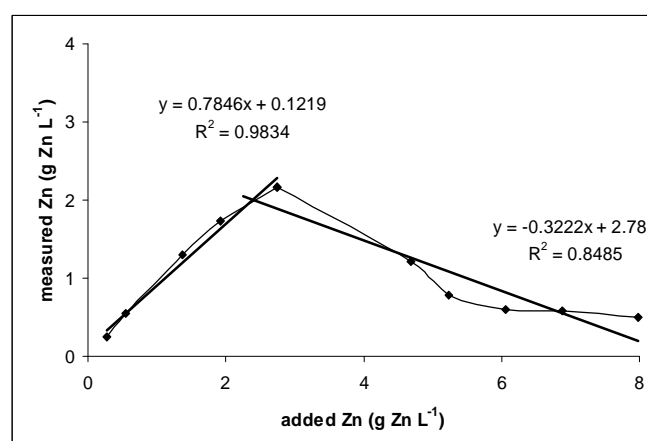


Fig.III-1c)

Figure III-1. Complexing capacity of lignosulfonates (LS) with Zn: 1a) spruce-NH₄, 1b) spruce -Na and 1c) eucalyptus-Na.

Figure III-1 shows the Zn complexing capacity of the three lignosulfonates tested. Zinc that remains in solution is represented versus the Zn added. In all cases, the graphs present a rising segment, which would correspond to the Zn-complexing process by lignosulfonates. This segment was followed by another decreasing segment, probably due to the coagulation of the material by an excess of metal (Villen et al., 2007). The intersection of the two segments represents the highest complexing capacity point; lines were obtained from the linear regression for the rising and decreasing segments (**Figure III-1**).

Table III-2 shows the amount of Zn complexed and the LS/Zn ratio at the highest complexing capacity point of the three products tested.

Table III-2. Zinc-Complexing Capacity and LS/Zn Ratio of the Three Commercial Lignosulfonates Tested

	Lignosulfonate products		
	<i>Spruce NH₄</i>	<i>Spruce Na</i>	<i>Eucalyptus Na</i>
<i>Zn-Complexing capacity (g of Zn L⁻¹)</i>	3.5	3.3	2.0
<i>LS/Zn Ratio</i>	1.7	2.1	5.0

An optimum Zn product for crops must have a high Zn-complexing capacity but a low LS/Zn ratio to support as much Zn as possible and reduce the production costs. In our experiment ammonium spruce LS had the highest Zn complexing capacity and the minor LS/Zn ratio. The spruce sodium LS had a Zn-complexing capacity similar to the ammonium form, but its LS/Zn ratio was higher. Besides, of the two spruce LS, the sodium form was more difficult to handle than the

ammonium form. It was sticky and remained in the laboratory material, introducing errors to the process. Moreover, industrial management of this product would not be possible, so this product were ruled out. Finally, eucalyptus sodium LS presented the smallest Zn-complexing capacity and the highest LS/Zn ratio. These different complexing capacities could be associated with the kind and percentage of the functional groups presented in the LS (Pang et al., 2008). **Table III-1** shows the percentage of total sulfur, phenolic, and carboxylic groups of the commercial LS tested. Spruce ammonium LS had the highest Zn-complexing capacity (**Table III-2**); it could be attributed both to its phenolic content, which is higher than in eucalyptus sodium product, and its total sulfur content (related to sulfonic groups), which is higher than for the sodium spruce LS. Pang et al. (2008) studied the calcium-complexing capacity of a LS based on the phenolic, carboxylic, and sulfonic groups content on its structure. These authors indicated that the concentration of complexing cation in the LS increased as the phenolic group concentration increased, whereas the amount of sulfonic groups changed little its complexing capacity. On the other hand, Pang et al. (2008) observed that as the carboxylic groups increased, the amount of calcium complexed decreased. These data agree with our results, as the sodium eucalyptus product tested in our experiment had the highest content of carboxylic groups and the lowest amount of complexed Zn. Pang et al. (2008) found that when the LS pH increased, the Ca-complexing ability increased. On the contrary, our results showed that when the commercial LS pH increased (**Table III-1**), the Zn-complexing capacity decreased (**Table III-2**). Finally, the ammonium spruce lignosulfonate was selected for testing the efficiency of this product as Zn fertilizer.

4-2.- Biological experiments

Initial concentrations of Zn, Cu, Mn, and Fe in seeds were determined prior to the hydroponic experiments. Values obtained in wheat seeds were 23, 7, 26, and 39 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry weight (DW), respectively. These data agree with Zn values reported by other authors in modern varieties of wheat (Cakmak et al., 2000) and barley (Ajouri et al., 2004). This relatively high Zn concentration in wheat seeds could be an initial source of this element when seeds are grown under Zn-deficient conditions. On the other hand, the concentrations of Zn, Cu, Mn, and Fe measured in corn seeds were 12, 21, 8, and 18 $\mu\text{g g}^{-1}$ of DW, respectively. The Zn concentration in corn seeds was lower than Zn measured in wheat grains.

4-2-1.- Wheat experiment at pH 7.0

Shoot and root dry weights were not significantly affected by the treatments applied (**Table III-3**).

Table III-3. Dry Weight and Zn Concentration in Wheat Shoots and Roots Phosphorus concentration (mg g^{-1} of DW \pm SE), $\text{Zn} \times 1000/\text{P}$ ratio, and Zn, Fe, Mn, and Cu concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ of DW \pm SE) in wheat shoots in experiment at pH 7.0. For each column, different letters denote significant differences among the treatments according to Duncan's multiple-range test ($\alpha = 0.05$).

Treatment	Shoots							Roots	
	DW (g)	Zn	P	Zn/P	Fe	Mn	Cu	DW (g)	Zn
0 Zn	1.7 \pm 0.1ns	25 \pm 4 c	1.6 \pm 0.1a	15	40 \pm 6 c	84 \pm 8 a	8 \pm 2 ab	0.7 \pm 0.1ns	23 \pm 1 c
ZnSO ₄	1.8 \pm 0.1	104 \pm 4 b	1.4 \pm 0.1b	77	84 \pm 6 b	48 \pm 5 b	10 \pm 2ab	0.6 \pm 0.1	136 \pm 12b
ZnLS	1.7 \pm 0.1	108 \pm 7 b	0.6 \pm 0.1c	180	103 \pm 15 a	42 \pm 8bc	7 \pm 1 b	0.7 \pm 0.1	123 \pm 9 b
ZnEDTA	1.7 \pm 0.1	132 \pm 6 a	0.3 \pm 0.1a	471	97 \pm 7 a	37 \pm 4 c	12 \pm 2 a	0.7 \pm 0.1	155 \pm 9 a

Similar data were obtained by Alvarez and Gonzalez (2006) when ZnEDTA and ZnLS (among other sources) were compared as fertilizers for corn plants in neutral soil. On the other hand, wheat plants presented a shoot growth that was higher than root growth in all treatments. Zhang et al. (1991) showed that under Zn deficiency shoot growth is usually more inhibited than root growth in nutrient solutions by wheat plants. In addition, Cumbus (1985) observed that root growth might even be enhanced at the expense of the shoot in wheat plants. However, in contrast, Alam and Shereen (2002) showed that the dry weight of wheat shoots was usually higher than that of roots harvested in a study with different concentrations of Zn (0.0 - 20.0 mg kg⁻¹) added as ZnSO₄ salt at neutral pH. These authors found that shoot growth was higher than root growth in Zn-sufficient and -deficient conditions.

Zinc concentration in shoots and roots presented significant differences among treatments (**Table III-3**). Plants with no added Zn showed the lowest Zn concentration, in both shoots and roots. The highest Zn concentration was achieved when ZnEDTA was added to the nutrient solution. Inorganic (ZnSO₄) and organic (ZnLS) sources did not present significant differences between them. Similar data were obtained by Gangloff et al. (2002) when ZnEDTA, ZnSO₄, and ZnLS were compared for corn plants in a limed soil at pH 7.2.

Some authors (Marschner, 1995; Alloway, 2004) remarked on the importance of the interaction between Zn and P in plant nutrition, despite the mechanisms responsible being still not completely understood. **Table III-3** shows that plants treated with ZnEDTA presented the lowest concentration of P in shoots.

Plants that were treated with ZnLS presented lower P concentrations in comparison with plants that had grown under 0 Zn and ZnSO₄ nutrient solutions. These data agree with Loneragan et al. (1982). These authors found in a hydroponic experiment for ochra (*Abelmoschus esculentum* L.) plants that when Zn concentration increased in shoot, a decrease in P concentration was observed. Cakmak and Marschner (1986) proposed that the main reason for the high phosphorus content in aerial tissues is that Zn deficiency enhances both the uptake rate of phosphorus by the roots and its translocation to the shoots. Moreover, the authors explained that this enhancement effect is specific for Zn deficiency and is not observed when other micronutrients are deficient. The $\text{Zn} \times 1000/\text{P}$ ratio (**Table III-3**) relates the antagonism between Zn and P in shoots. This ratio was higher in plants treated with ZnLS in comparison with plants treated with ZnSO₄ and lower when it was compared to ZnEDTA plants. As in our experiment the P source did not change in the nutrient solutions, one could think that the ratio $\text{Zn} \times 1000/\text{P}$ was determined by the availability of Zn in the nutrient solution.

4-2-2.- Wheat experiment at pH 8.0

Results obtained in the experiment at pH 8.0 with wheat plants are shown in

Table III-4.

Table III-4. Dry Weight and Zn Concentration in Wheat and Corn Shoots and Roots Phosphorus concentration (mg g^{-1} of DW \pm SE), Zn \times 1000/P ratio, and Zn, Fe, Mn, and Cu concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ of DW \pm SE) in wheat and corn shoots in experiments at pH 8.0. For each column, different letters denote significant differences among the treatments according to Duncan's multiple-range test ($\alpha = 0.05$).

Treatment	Shoots							Roots	
	DW (g)	Zn	P	Zn/P	Fe	Mn	Cu	DW (g)	Zn
<i>Wheat</i>									
0 Zn	0.9 \pm 0.1b	33 \pm 2 c	0.9 \pm 0.1a	33	70 \pm 2c	43 \pm 4ns	10 \pm 2 ab	0.7 \pm 0.2b	27 \pm 4 b
ZnSO ₄	0.8 \pm 0.1b	75 \pm 19 b	0.9 \pm 0.1a	87	88 \pm 10b	37 \pm 4	7 \pm 1 b	0.6 \pm 0.1b	40 \pm 1 b
ZnLS	1.6 \pm 0.1a	105 \pm 11a	0.5 \pm 0.2b	233	116 \pm 9a	37 \pm 5	12 \pm 2 a	1.3 \pm 0.3a	110 \pm 12a
<i>Corn</i>									
0 Zn	1.5 \pm 0.1b	23 \pm 4 c	7.3 \pm 0.3a	4	62 \pm 2 ns	63 \pm 6a	10 \pm 2 ab	1.6 \pm 0.2ns	28 \pm 2 c
ZnSO ₄	1.5 \pm 0.1b	52 \pm 4 b	4.0 \pm 0.6b	28	60 \pm 5	44 \pm 3 b	7 \pm 1 b	1.5 \pm 0.1	92 \pm 15b
ZnLS	2.0 \pm 0.1a	152 \pm 16 a	2.1 \pm 0.2c	149	61 \pm 6	42 \pm 5 b	12 \pm 2 a	1.2 \pm 0.2	189 \pm 10a

In simulated calcareous conditions, plants grown under ZnLS treatment presented a significantly higher shoot dry weight than the plants treated with ZnSO₄ and, as expected, than the plants grown in solution without any added Zn. Similar results were found in roots. As in the pH 7.0 experiment, wheat plants presented a shoot growth that was higher than root growth in all treatments. The results agree with the trend obtained by Alam and Shereen (2002).

The highest Zn concentration in both shoots and roots has been measured in plants grown under ZnLS treatment. On the other hand, plants with ZnSO₄ presented greater Zn concentration in shoots than 0 Zn plants. Similar differences between ZnLS and 0 Zn treatments were found by Rico et al. (1996) when they

applied ZnLS to maize plants in calcareous soil. The Zn concentration measured in plants treated with ZnSO_4 was lower than the same plants of the experiment at pH 7.0. This could be explained on the basis of the fact that when an inorganic salt (such as ZnSO_4) is added, in alkaline conditions, the Zn^{2+} activity decreases. Some soluble forms of Zn can precipitate at basic pH. These precipitate forms (such as zinc hydroxides) did not form an available source of Zn by the crops in the nutrient solution (Alloway, 1995; Burriel, 2003).

In our experiment, P shoot concentrations measured in plants grown under 0 Zn and ZnSO_4 treatments did not present significant differences between them (**Table III-4**). Plants with ZnLS in their nutrient solution had a significant decrease in P measured in comparison with other treatments. These results agree with Cakmak and Marschner (1986) and with Loneragan et al. (1982), as explained in the previous experiment. A different explanation of our results could be the interaction between P and Zn mentioned by other authors in calcareous conditions. May and Pritts (1993) showed that Zn interacted with soil P by formation of insoluble phosphates of Zn for strawberry crops in a calcareous soil.

On the other hand, for all treatments, the concentration of P measured in the aerial part of the plants was lower than in the pH 7.0 experiment. There could be a chemical reason for this. In general, the uptake of phosphorus in plants is mainly as H_2PO_4^- form (Marschener, 1995). The formation constant ($\log K^\circ = 7.20$), which relates $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, is numerically equal to the pH at which the reacting species have equal activities. An increase in pH of 1 unit decreases the ratio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ by 10-fold (Lindsay, 1979). The $\text{Zn} \times 1000/\text{P}$ ratio keeps the trend shown in the pH

7.0 experiment but with higher amounts of these ratios in all treatments. This could be attributed to the decrease in the availability of P at pH 8.0.

4-2-3.- Corn experiment at pH 8.0

Results obtained for corn plants in the pH 8.0 experiment are shown in **Table III-4**. In the same way as in the experiment with wheat at pH 8.0, corn plants grown with ZnLS supply presented a significantly higher shoot dry weight than the plants of the other treatments. This was confirmed by other authors including Goos et al. (2000) for maize plants grown in soil under greenhouse conditions. Root dry weights were not significantly affected by the treatments applied. The highest Zn concentration in shoots and roots was found in plants grown under ZnLS nutrient solution, as in the wheat pH 8.0 experiment. The ZnSO_4 treatment was less effective, probably due to the precipitation of the Zn in the nutrient solution at pH 8.0 (Alloway, 1995; Burriel, 2003), which was much lower for the ZnLS.

Phosphorus concentration in corn shoots presents significant differences among treatments. The largest P level was found in control plants followed by plants treated with ZnSO_4 . The lowest P concentration was measured in plants grown in ZnLS nutrient solution. The same trend was observed in wheat plants but with much lower P values than in the corn plants. The results agree with those of Loneragan et al. (1982). Those authors explained that in the absence of Zn, or with low external Zn concentrations, the P level in shoots is higher when the level of Zn supply is normal.

The $\text{Zn} \times 1000/\text{P}$ ratio in corn shoots presented the same trend shown in wheat; the ZnLS treatment presented higher values of this index than the other treatments. Differences found in corn were higher than in wheat, which could be related to the higher sensitivity of the maize crop in comparison with wheat plants to the Zn deficiency (Martens and Westermann, 1991). The $\text{Zn} \times 1000/\text{P}$ ratio seems to be a sensitive index of Zn nutrition as it shows important differences among Zn treatments.

5.- Conclusions

Lignin represents a basic substance that can exhibit various kinds and percentages of functional groups depending on the vegetal species from which it is derived, in contrast to other biopolymers that have a regular structure (Alonso et al., 2005). Moreover, the structural changes suffered by lignin (therefore, in lignosulfonates, too) during pulping and sulfonation processes can exert a great influence on its characteristics (such as complexing capacity) (Alvarez-Fernandez et al., 2005). The AOAC modified method combined with the addition of metal solutions may provide a tool for the determination of complexing capacity in lignosulfonates (Villen et al., 2007).

Some authors have proved the highest efficiency of ZnEDTA as Zn fertilizer in calcareous and neutral soils (Alvarez and Gonzalez, 2006), but the high cost of the products (Lucena, 2006) forced farmers to apply inorganic salts as sulfate in extensive grown crops such as cereals (Cakmak et al., 1996). This fact and some environmental problems (Joyce et al., 1988) limit the utilization of organic chelates

to cash crops. Our results give evidence that ZnLS is a useful Zn source for wheat and corn and seems to be more efficient than ZnSO_4 to correct Zn deficiency in both plants under hydroponic calcareous conditions. Further experiments are needed to evaluate the efficiency of ZnLS as Zn source of extensive crops under field conditions.

**IV.- EFFICIENCY OF A NPK FERTILIZER WITH
ADHERED ZINC LIGNOSULFONATE AS A ZINC
SOURCE FOR MAIZE (*Zea mays* L.)**

1.- Abstract.....	100
2.- Introduction.....	101
3.- Materials and Methods.....	104
3-1.- Reagents.....	104
3-2.- Preparation of the Zn adhered NPK product.....	106
3-3.- Perlite leaching columns experiments.....	107
3-4.- Perlite plant experiment.....	108
3-5.- Growth chamber soil experiment.....	109
3-6.- Field experiments.....	111
3-7.- Statistical analyses.....	113
4.- Results and Discussion.....	114
4-1.- Preparation of the Zn adhered NPK product.....	114
4-2.- Perlite leaching columns experiment.....	115
4-3.- Perlite plant experiment.....	119
4-4.- Growth chamber soil experiment.....	122
4-5.- Field experiments.....	125
5.- Conclusions.....	128

1.- Abstract

The aim of this work was to evaluate the efficiency of a NPK fertilizer (8:15:15) with a Zn lignosulfonate (ZnLS) adhered as Zn source for maize plants. This product was compared, in three experimental designs, with the same NPK fertilizer with ZnSO₄ adhered and with no Zn adhered. The first and the second assays were carried out in a growth chamber by using perlite and a calcareous soil as substrate and the third experiment was raised in two calcareous fields. In general, growth chamber experiments showed that plants treated with NPK+ZnLS presented the highest dry weight and Zn concentrations in shoots. Also at field experiments, the Zn concentration in shoots was significantly high in plants treated with NPK+ZnLS. The grain harvested showed that this treatment gave the highest values in one location, but in the other no significant differences were observed. Although further research is required, we can conclude that NPK+ZnLS product could be a suitable source of Zn for maize crops.

2.- Introduction

About fifty percent of the soils used for cereal production in the world contain low levels of plant-available Zn, which reduces not only grain yield but also the nutritional quality of the grains harvested (Cakmak et al., 1997). Generally, the world regions with Zn-deficient soils are also characterized by widespread Zn deficiency symptoms in humans. Cereals crops play an important role in satisfying daily calories intake in developing world, but they are inherently very low in Zn concentrations in grain, particularly when grown on Zn-deficient soils (Cakmak, 2008). High pH and CaCO_3 content of calcareous soils are usually referred to as the main reasons for the low availability of Zn (Khoshgoftarmanesh et al., 2004). This deficiency is traditionally corrected by soil application of inorganic Zn salts, such as ZnSO_4 , which could be fixed to a large extent when they are applied to calcareous soils (Arce et al., 1992). The addition of synthetic chelates, such as ZnEDTA or ZnDTPA, would be a better solution for Zn deficiency but metal chelates are used only in cash crops, because of their high cost (Lucena, 2006). Furthermore, although synthetic chelates seem to be the most efficient Zn fertilizers due to their high stability in the soil solution, the great mobility through the soil profile of some of them favored their leachability (Alvarez et al., 1996; Modaihsh, 1990). On the other hand, this fact could also improve the Zn uptake by plants.

An alternative to inorganic salts and synthetic chelates could be the Zn complexes. Zinc lignosulfonate (ZnLS) is a complexed organic fertilizer that is formed by reacting ZnSO_4 with sulfonated lignin wastes (Gangloff et al., 2006). Lignosulfonates (LS) are by-products of paper and pulp industries that are rather

cheap and have been used as oil well dispersants, dye-stuff and as agricultural chemicals (Yang et al., 2007). Gangloff et al. (2006) observed that ZnLS presented greater Zn availability than inorganic Zn salts and required lower application rates to satisfy plant requirements. Also, the reduction of Zn leached when ZnLS complexes were added to the soil in comparison with synthetic chelates application minimize the risk of contamination in some environmental compartments. This fact was observed by some authors when they compared the Zn lixiviation in a calcareous soil treated with ZnLS and Zn-chelate (Alvarez et al., 1996; Gonzalez et al., 2008). The authors found no micronutrient movement in calcareous soil when ZnLS was applied, while the addition of Zn-chelate/s showed Zn migration and leaching. The lixiviation of some synthetic chelates to the surface waters is an environmental problem found in some European rivers (Bucheli-Witschel and Egli, 2001).

The incorporation of micronutrients into mixed fertilizers (such as NPK) is a procedure recognized as an economical mean of applying trace elements to soils and plants (Jackson et al., 1962). Zn enriched NPK fertilizers offer a rapid solution to the Zn deficiency in cereal crops (Cakmak, 2008). So, the application of NPK with ZnLS to cereal crops in calcareous soil could provide economical and environmental advantages in comparison with the addition of other Zn sources as inorganic salts or synthetic chelates.

When Zn sources were incorporated into NPK fertilizers, this element may react with the NPK components. These reactions could affect the bioavailability of the metal applied through the fertilizer. Mortvedt and Giordano (1969) compared

the efficiency of several chemical extractants in predicting the immediate effectiveness of Zn for maize when ZnSO_4 was incorporated into various macronutrient fertilizers. These authors found good correlation coefficients between Zn extracted with diethylenetriaminepentaacetic acid (0.005M DTPA + 0.01M CaCl_2 ; pH buffered at 7.3) and the agronomic effectiveness of Zn sulfate incorporated to various macronutrient fertilizers. Thus, according to these authors, a previous ammonium bicarbonate (AB)-DTPA Zn extraction of the adhered NPK fertilizers could provide clues of their efficiency as Zn fertilizers.

The aim of the present work is to evaluate the efficacy of a ZnLS as Zn source when it is adhered to a NPK fertilizer to provide Zn to maize plants under controlled and field conditions.

3.- Materials and Methods

3-1.- Reagents

All reagents used in the experiments were of recognized analytical grade. The water used for the preparation of reagents or standards conforms to EN ISO 3696 (1987), grade I, free of organic contaminants.

Zinc lignosulfonate (ZnLS) was prepared from a spruce ammonium lignosulfonate kindly provided by Lignotech Ibérica S.A. Some physicochemical characteristics of the product given by the manufacturer were: pH 4.4; total S 6.2 %; carboxylic groups 2.6 % and phenolic groups 1.9 % while **Figure IV-1** illustrates the FT-IR spectrum of the NH_4 spruce LS obtained on a FTIR Bruker IFS60v spectrophotometer with a MTC detector and diffuse reflectance (DRIFT) accessory.

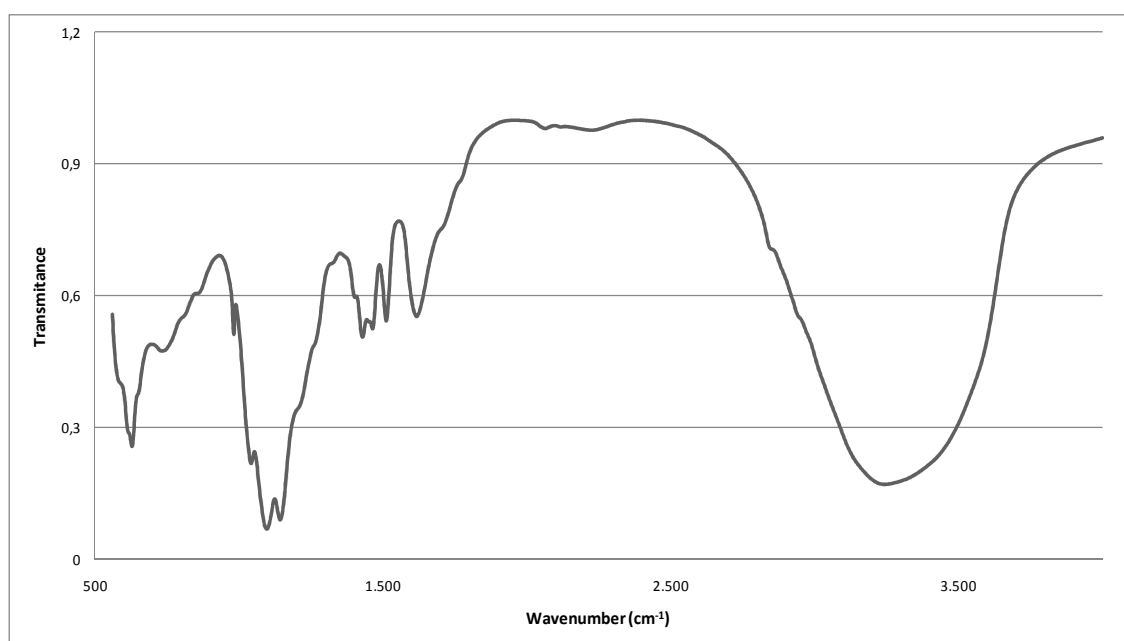


Figure IV-1. Infrared spectrum of spruce ammonium lignosulfonate (NH_4 -LS) employed in this work.

Spectra of LS samples were recorded in the region 4000-400 cm^{-1} at a resolution of 4 cm^{-1} in the transmittance mode, using the potassium pellet method. The main bands observed are in agreement with those reported in other works for lignins, technical lignins and LS (Boerio et al., 2004). All the LS follow a common pattern, with a broad band 3600-3300 cm^{-1} corresponding to hydroxyl groups in phenolic and carboxylic acids and several bands with variable intensity in the fingerprint region (1900 to 800 cm^{-1}). In this region the main features appear at 1770 cm^{-1} (aromatic acetoxy groups), 1715 and 1630 cm^{-1} (unconjugated carbonyl-carboxyl stretching), 1600 to 1500 cm^{-1} (C=C skeletal vibrations), 1470-1460 cm^{-1} (C-H deformation combined with aromatic ring vibrations), 1260 cm^{-1} (C=O stretch), 1230-1215 cm^{-1} (C-C, C-O and C=O stretching), 1140 cm^{-1} (C-H in plane deformation), 1050 cm^{-1} (complex vibration associated with the C-O, C-C stretching and COH bending in polysaccharides) and 840 and 810 cm^{-1} (C-H out-of-plane deformations). The band appearing at 620-660 cm^{-1} is assigned to the sulfonic groups (S-O stretching vibration) formed from the reaction of sodium sulfite with the secondary OH of the aliphatic side chain of lignins.

The spruce ammonium lignosulfonate was selected based on previous data of its higher Zn complexing capacity in comparison with a spruce and an eucalyptus sodium lignosulfonate (Martin-Ortiz et al., 2009). Based on the maximum complexing capacity data (Martin-Ortiz et al., 2009), a ZnLS stock solution (60 mM of Zn) was prepared by mixing the suitable amount of LS and the corresponding volume of a 100 g Zn L^{-1} of ZnSO_4 solution. After the agitation of the mixture during one night in the dark, the solution was made up to volume. Total Zn concentration of the solution was assessed by Atomic Absorption spectroscopy (AAs) (AAnalyst 800,

Perkin Elmer) and the complexed Zn concentration was estimated by using the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) modified method (Villen et al., 2007).

3-2.- Preparation of the Zn adhered product

Eight samples of 100 g of NPK 8:15:15 (kindly provided by Fertiberia S.A.) were placed into a 1.0 kg kneading machine (MRPI-06 SBS) where 50 mL of the ZnLS solution were added with a spray nozzle at regular intervals of 0.2 mL min⁻¹. After this, all samples were air-dried at room temperature during 12 hours. The Zn concentration in the NPK products was supposed to be around 2 g of Zn kg NPK⁻¹ (0.2 % of Zn in the NPK). The same procedure was used in the preparation of NPK with ZnSO₄ adhered, but changing the ZnLS solution by one of 60 mM of Zn applied as ZnSO₄ sugar-coating solution. The sugar-coating solution formulation was 45% (w/w) sucrose, 30% (w/w) ZnSO₄ solution and 25% (w/w) talc.

The total Zn from each sample was measured by following the CE 2003/2003 9.1 Method (2003). For that purpose, 5 g of the Zn adhered NPK was placed into a 250 mL beaker. Fifty mL of 6 M HCl were added in 10 mL portions and then 50 mL of H₂O were added. The beaker was stopped and vigorously shaken. The solution was first boiled during 30 min, cooled, and then transferred to a 500 mL volumetric flask and made up to volume. Eight replicates for each sample were done. The AB-DTPA extractable Zn, as described by Soltanpour and Workman (1979), was measured in the NPK products. Half gram of product was placed into a 50 mL beaker. Twenty mL of the extracting solution were added (NH₄HCO₃ 1 M + DTPA

0.005 *M* adjusted to pH 7.6). The solution was stirred during 15 min at 180 cycles min⁻¹, then filtered into a 100 mL volumetric flask and made up to volume. Eight replicates for each sample were done. Zinc concentration in both portions (total and extractable Zn) was measured in AAs.

3-3.- Perlite leaching column experiment

Polyvinyl chloride (PVC) columns (30 cm length, 6 cm width) were filled up to 17 cm with perlite (Projar S.A.), then 0.15 g of the fertilizer were applied and then 3 cm more of perlite were added. At the top of each column, 5 cm of acid washed sand (0.5 - 2 mm of diameter) were incorporated in order to avoid evaporation. The treatments tested were NPK (8:15:15) with no Zn adhered and the same NPK with ZnSO₄ (NPK+ZnSO₄) and ZnLS (NPK+ZnLS) adhered.

Twenty mL of nutrient solution were added every 3 days to the upper zone of the columns. The chemical composition of the nutrient solution was as follows (mM): 3.0 Ca(NO₃)₂, 2.0 K₂SO₄, 2.0, MgSO₄, 1.0, KH₂PO₄, 1.0 CaSO₄, 0.5 NaCl. Microelements in μ M were: 50 FeEDDHA (Torneo, Bayer), 25 H₃BO₃, 5.0 MnSO₄, 0.5 CuSO₄, 0.5 (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O. The N, P and K concentrations in the solution were reduced in respect to the standard solution due to the addition of the NPK fertilizer. The nutrient solution readjustment was calculated by using the speciation program VMinteq. The pH of the nutrient solution was adjusted to 8.0 with NaOH 0.5 *M*. Leaching solutions were collected in 50 mL Erlenmeyer flasks where P and Zn concentrations were measured. After 33 days, the perlite inside the columns was divided in four layers (5 cm each) and AB-DTPA extractable Zn (Soltanpour and

Workman, 1979) was determined on each one. Both Zn in the leachates and AB-DTPA extractable Zn from the perlite layers were measured by AAs. Phosphorus concentration was measured by an UV-visible method with a Shimadzu UV-160A spectrophotometer (Kuo, 1996). Three replicates (columns) per treatment were conducted.

3-4.- Perlite plant experiment

Maize seeds (*Zea mays* L. cv Agrano C500) sold by Syngenta-Seeds, were germinated in the dark on moist filter paper at 30°C. After germination, seedlings were transferred to 12L containers with a complete nutrient solution without Zn. The composition of Zn deficient nutrient solution in mM was: 4.0 KNO₃, 3.0 Ca(NO₃)₂, 2.0 KH₂PO₄, 1.0 MgSO₄, 0.5 mM NaCl, and microelements in µM: 50 FeEDDHA, 25 H₃BO₃, 5.0 MnSO₄, 0.5 CuSO₄, 0.5 (NH₄)₆ Mo₇O₂₄·4H₂O. This nutrient solution was buffered by a DTPA-excess solution (Parker et al., 1992) for precise imposition of Zn deficiency and the pH was kept at 8.0 ± 0.3.

After 4 days, maize seedlings were transferred to 15 L polystyrene pots (1 L solution compartment at the bottom) filled with moistened perlite about 5 cm before the top of the pot. On the top of the perlite, 14 g of NPK 8:15:15 were added. Three treatments of NPK 8:15:15 were applied: NPK without added Zn, NPK with ZnSO₄ adhered (NPK+ZnSO₄) and NPK with ZnLS adhered (NPK+ZnLS). After the NPK addition, pots were filled with perlite to the brim and moistened prior to the seedlings transplant. Five maize plants per pot were placed and a diluted nutrient solution (the same as in perlite leaching columns experiment) was added. In this

experiment 0.5 g of solid CaCO_3 was placed in the lower compartment of the pots in order to buffer the solution and simulate calcareous conditions. Four replicates per treatment were placed in a growth chamber, with a photoperiod light / night of 16 h / 8 h; temperature 25°C / 18°C and relative humidity 50% / 80%. The radiation flux was $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

After 28 days, shoots were collected, weighted and thoroughly washed with deionised water. Then, plant material was dried at 70°C for at least 2 days to determine dry weight. Concentration of Zn, Mn, Cu and Fe were measured by AAs and phosphorus by a colorimetric method (Kuo, 1996) after the dry mineralization of the samples. In addition to these determinations, substrate samples of perlite were taken at two different depths (10 and 20 cm) in the pots where AB-DTPA extractable Zn (Soltanpour and Workman, 1979) that remained after the experiment was determined.

3-5.- Growth chamber soil experiment

Polyethylene 5.5 L pots were filled up until about 5 cm from the top with a mixture of 1.8 kg of soil (30%) and 4.2 kg of sand (70%). The agricultural soil used was collected (first 20 cm layer) from a location situated in Castronuevo de Esgueva, Valladolid, Spain ($41^\circ40'50''$ N, $4^\circ36'9''$ W, alt. 771 m). Soil characteristics are shown in **Table IV-1**.

Table IV-1. Physicochemical characteristics of the soils used in the growth chamber experiment, and in both field experiments located in Quinto and Barrax.

Soil Properties	<i>1.Growth Chamber</i>	<i>2.Quinto</i>	<i>3.Barrax</i>
<i>Sand (g kg⁻¹)</i>	530	640	560
<i>Silt (g kg⁻¹)</i>	335	240	320
<i>Clay (g kg⁻¹)</i>	135	120	120
<i>OM (%)</i>	1.5	1.7	1.5
<i>CaCO₃ (%)</i>	41	33	45
<i>pH</i>	7.8	8.2	8.2
<i>Exchangeable K (cmol_c kg⁻¹)</i>	281	70	325
<i>Olsen P (mg kg⁻¹)</i>	27	14	25
<i>AB-DTPA Zn (mg kg⁻¹)</i>	0.5	0.9	0.4
<i>AB-DTPA Fe (mg kg⁻¹)</i>	13	14	12
<i>AB-DTPA Mn (mg kg⁻¹)</i>	9.2	12	10
<i>AB-DTPA Cu (mg kg⁻¹)</i>	1.3	1.3	1.0

Soil pH was determined at a soil to water ratio of 1:2 (w/v), oxidized soil OM, potassium and exchangeable cations concentrations were measured by following the official methods (Official Methods, 1994). The sand used was a normalized sand (0.5 - 2 mm of diameter), provided by Instituto Eduardo Torroja (CSIC, Spain). The soil:sand mixture was moistened and three treatments (NPK, NPK+ZnSO₄ and NPK+ZnLS) were applied with four replicates per each one. In this experiment, 2 g of NPK was added to each pot. As in the perlite experiment, the amount of Zn in the fertilizers was expected to be 0.2%. After the NPK addition, pots were completely filled with the sand soil mixture to the brim. Maize seeds were germinated and Zn deficiency was induced as it is described in the perlite plant experiment. Then, four maize seedlings were transferred to each pot. A nutrient solution (the same as in the

perlite experiments in order to make sure that Zn deficiency was the only limiting factor) was added to the pots.

Shoots were collected 28 days after the transplant. Dry weight and concentration of Zn, P, Fe, Mn and Cu were determined in shoots. Soil samples were taken at different depths (10 and 20 cm) in the pots at the end of the experiment where AB-DTPA extractable Zn (Soltanpour and Workman, 1979) was determined.

3-6.- Field experiments

A field experiment was carried out from May 2007 to November 2007 on a place located at Quinto de Ebro (41°25'32" N, 0°31'00" W, altitude 199 m), Zaragoza, Spain. Soil characteristics are shown in **Table IV-1**. The climatic data provided by the National Institute of Meteorology (INM) were (crop cycle averages): temperature 19 °C; maximum temperature 26°C; minimum temperature 13 °C; relative humidity 56 % and precipitation 27 mm. The experimental design was a split-plot design with four randomized sub-plots per treatment. Sub-plots were 18 m long by 18 m wide (324 m²). The total area of the experiment was 3900 m² approximately. Each plot was treated with minimum tillage consisted of two tillage operations with a chisel plow and two disking to a depth of 10 cm. Treatments (NPK, NPK+ZnSO₄ and NPK+ZnLS) were applied before sowing. Thirty kilograms of each fertilizer were applied to each of the four sub-plots disposed in randomized blocks.

Preparation of the NPK products was carried out in the Agronomic Laboratory of Fertiberia S.A. following the procedure described in the preparation

of the adhered NPK products but with 500 times higher scale. For each treatment, 300 kg of product were prepared in six batches of 50 kg each. For each batch, three samples were collected and the available Zn was determined. Means of available Zn measured in the NPK with ZnLS and ZnSO₄ adhered were 1310 and 190 mg Zn kg⁻¹ of NPK respectively.

Maize seeds were sown in May of 2007 using a sower machine. Distance between crop rows was 0.69 m, and plant population was approximately 2600 seeds per sub-plot. Nitrogen as urea (500 kg ha⁻¹) was added to the soil one month after germination of the seeds. The experimental plot was border irrigated throughout all growing season. Farming practices carried out in the experiment area were similar to those of the farmers in the region.

In November, 2007 maize plants were harvested with a harvesting machine. Grain yield, dried weight and concentration of Zn, P, Fe, Mn and Cu were determined in shoots and grain following the same procedure described for the previous experiments. Whole plant except ear, grains and roots will be called as shoot.

The second field experiment was carried out in Barrax (Albacete, Spain, 39°02'34" N, 2°11'08" W, altitude 708 m) from May 2007 to November 2007. Soil characteristics are shown in **Table IV-1**. The climatic data provided by the INM were (crop cycle averages): temperature 18°C; maximum temperature 26°C; minimum temperature 11°C; relative humidity 58% and precipitation 15 mm. In this experiment the plot was spray irrigated throughout all the growing season. The experimental design was the same of the previous experiment.

Maize was harvested on November, 2007. Sub-plots were harvested by a harvesting machine and yields were measured. Shoots and grain Zn, P, Fe, Mn and Cu concentrations were determined following the same procedure described for the previous experiments.



3-7.- Statistical Analyses

Differences among fertilizer treatments were analyzed by one-way ANOVA, followed by a post hoc multiple comparison of means using the Duncan test ($\alpha=0.05$ for growth chamber experiments and $\alpha=0.1$ for the field ones). Statistical analysis was performed with the SPSS 15.0 program.

4.- Results and Discussion

4-1.-Preparation of the Zn adhered NPK product

Table IV-2 shows the total and AB-DTPA extractable Zn measured in the NPK with ZnLS and ZnSO₄ adhered. Similar total Zn concentration in both products was found, but the available Zn concentration was much lower in the NPK+ZnSO₄ than in the NPK+ZnLS product.

Table IV-2. Total and AB-DTPA extracted Zn in the NPK with ZnLS and ZnSO₄ adhered products. Data values are means \pm SE of each series of samples. CV= Coefficient of variation.

Series	NPK+ZnLS		NPK+ZnSO ₄	
	Total Zn	AB-DTPA Zn	Total Zn	AB-DTPA Zn
	(mg Zn kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg Zn kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)
1	1210 \pm 30	980 \pm 30	1430 \pm 30	260 \pm 20
2	1250 \pm 50	1150 \pm 30	1390 \pm 30	260 \pm 30
3	1320 \pm 40	1130 \pm 70	1400 \pm 50	220 \pm 30
4	1310 \pm 30	1030 \pm 20	1420 \pm 40	260 \pm 20
5	1230 \pm 30	1140 \pm 50	1410 \pm 30	260 \pm 30
6	1310 \pm 20	1160 \pm 70	1380 \pm 30	290 \pm 30
7	1220 \pm 50	950 \pm 50	1410 \pm 30	280 \pm 20
8	1310 \pm 30	1070 \pm 60	1340 \pm 20	250 \pm 30
Mean	1270 \pm 20	1080 \pm 30	1400 \pm 10	260 \pm 30
CV (%)	4	8	7	7

The percentage of available Zn in the NPK+ZnLS product was 85% of the total Zn of the fertilizer and 19% in the case of the NPK+ ZnSO₄. This difference was attributed to the LS presence.

The AB-DTPA extractable Zn in soils is considered as the Zn fraction available for crops (Soltanpour and Wokman, 1979). Mortvedt and Giordano (1969) tried to correlate the percentage of Zn incorporated as ZnSO_4 to various macronutrient fertilizers (NPK, urea, ammonium polyphosphate...) with its agronomic effectiveness for maize. They determined the Zn content of each fertilizer by using several extractants: H_2O , HCl, acid K_2SO_4 , and solutions of different chelating agents; and concluded that there was a good correlation between the DTPA extracted Zn from the fertilizer and their agronomic efficacy for maize. In spite of the higher value of total Zn concentration of the NPK+ ZnSO_4 fertilizer, a higher efficacy of the NPK+ZnLS fertilizer was expected, due to its Zn complexed fraction.

Table IV-2 also shows the coefficients of variation (CV) for the total and AB-DTPA extractable Zn determinations. The CV was used to verify the reproducibility rate of the Zn coating methods used in NPK+ZnLS and NPK+ ZnSO_4 fertilizers. This reproducibility could be related with the homogeneity of the Zn added into the fertilizers. Authors established a limit of acceptance of $\text{CV} \leq 10\%$. While AB-DTPA extractable Zn presented CV values higher than the total Zn, the CV of both fertilizers do not reach the threshold selected, so both fertilizers were considered as homogeneous.

4-2.- Perlite leaching columns experiment

Leached Zn was not detected from any of the columns where NPK, NPK+ZnSO₄ or NPK+ZnLS fertilizers were applied. Results are similar to those obtained by Alvarez et al. (1996) in a leaching column experiments done with different calcareous soils. The authors did not observe mobilization of Zn through the column when a ZnLS was applied. Moreover, in a subsequent leaching experiments, Alvarez et al. (2001) found that in a slightly acid soil (pH 6.2) and in a neutral soil (pH = 7.1), the Zn applied as ZnLS remained at the same depth where it was placed. In both experiments, authors pointed out the relationship between the low mobility of Zn and the fixation of ZnLS to some soil components.

In our experiment columns were filled with expanded perlite. Although this material is chemically and thermally inert (Bastani et al., 2006) it maintains a certain cation adsorption capacity (Vazquez and Carpena-Ruiz, 2005) surely due to the high porosity and the presence of silicate on its structure.

The highest amount of available Zn in the four sections of the columns divided at the end of the leaching experiment was found in the first 5 cm of the columns treated with NPK+ZnLS. The concentration of AB-DTPA Zn measured at the first 5 cm of perlite was two times higher at NPK+ZnLS (1.2 mg Zn kg⁻¹ of perlite) columns than in the NPK+ZnSO₄ (0.52 mg Zn kg⁻¹ of perlite) columns (**Figure IV-2**).

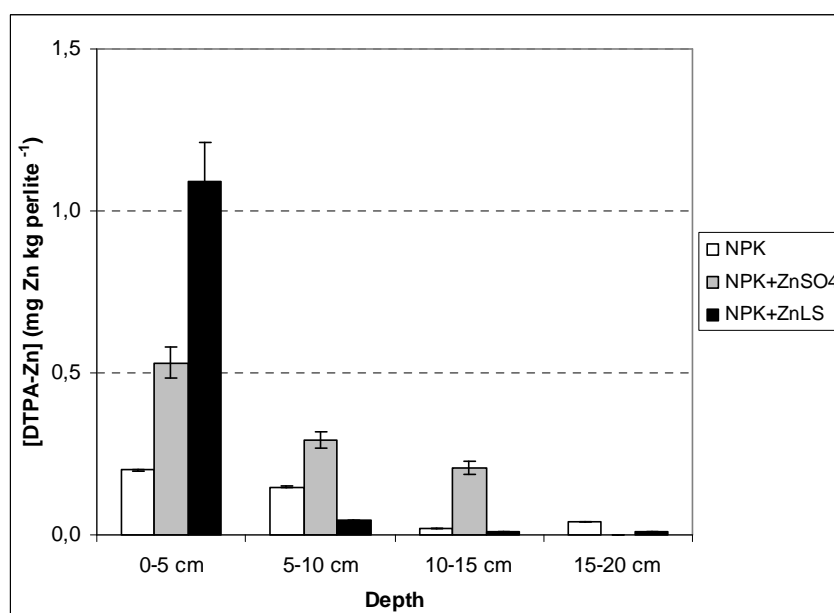


Figure IV-2. Ammonium bicarbonate-DTPA extractable Zn concentration (mg L^{-1}) measured at different depths of the perlite columns at the end of the leaching experiment. Error bars denote standard errors of the means ($n=3$).

In terms of AB-DTPA Zn distribution in perlite columns, most of the Zn applied (98%) was retained in the first 5 cm when NPK+ZnLS was added (**Figure IV- 2**). On the other hand, a slight mobilization of Zn to lower levels of the columns was found in the case of NPK+ZnSO₄. For this treatment, the Zn distribution along the column was: 55% in the first 5 cm, 25% between 5 and 10 cm and 10% between 10 and 15 cm of depth. Singh (1974) observed a Zn movement to a lower depth of calcareous and acid soils when ZnSO₄ was applied. But Gangloff et al. (2006) did not observe this mobilization when applied ZnSO₄ to a calcareous soil. Despite this, both Singh (1974) and Gangloff et al. (2006) agreed that most of the Zn added as ZnSO₄ was found in the area of application of the fertilizer. This fact was also observed in our experiment.

In columns where NPK without any Zn source was added, residual concentrations of Zn ($0.1 - 0.2 \text{ mg of Zn kg}^{-1}$ of perlite) were found in the first 10 cm (**Table IV-2**). This Zn could come from the raw materials of NPK fertilizers. In the NPK used for these experiments, $40 \text{ mg of total Zn kg}^{-1}$ of fertilizer were determined.

The increase of the P concentration in the leaching solutions since the 9th day (**Figure IV-3**) showed the beginning of the NPK fertilizer dissolution. Thus, the decrease of P concentration since the 27th day of washings would indicate that the fertilizer was almost depleted.

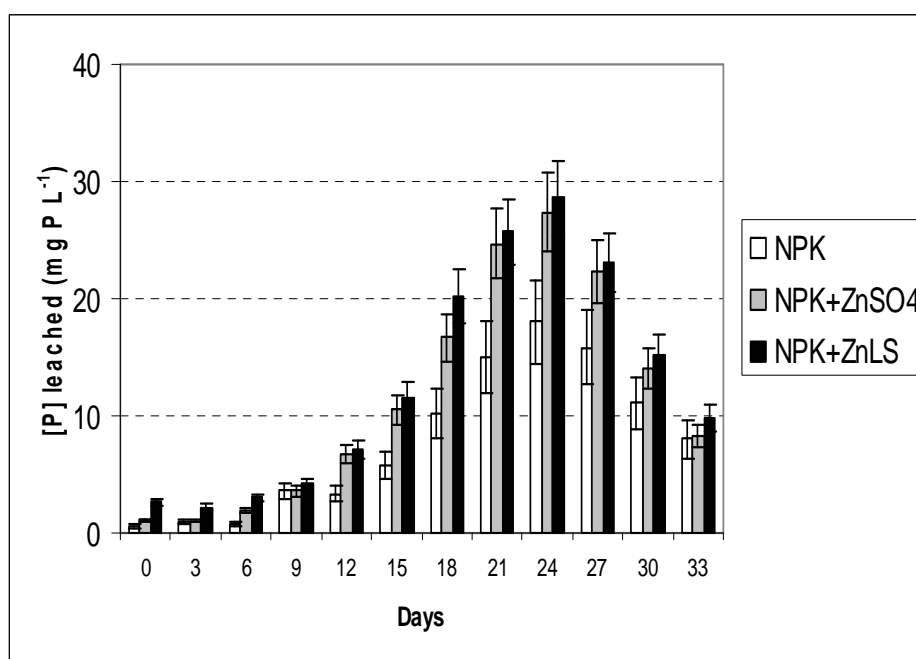


Figure IV-3. Phosphorus concentration (mg L^{-1}) measured in the leached solution of the perlite columns. Error bars denote standard errors of the means ($n=3$).

4-3.- Perlite plant experiment

Maize plants treated with NPK+ZnLS rendered the highest dry weight in comparison with plants treated with NPK and with NPK+ZnSO₄ (**Table IV-3**). Even though, the dry weight of plants treated with adhered NPK (ZnLS and ZnSO₄) did not show statistical differences between them.

Table IV-3. Dry weights (g±SE); Zn, Fe, Mn, Cu concentration (µg g⁻¹DW±SE); Phosphorus concentration (mg g⁻¹DW±SE) and P/Zn ratio in maize shoots of perlite and soil experiments. For each column, different letters denote significant differences among the treatments according to Duncan's multiple-range test (α=0.05) (n= 4)

Maize shoots perlite experiment							
<i>Treatments</i>	<i>DW (g)</i>	<i>Zn</i> (µg g ⁻¹ DW)	<i>P</i> (mg g ⁻¹ DW)	<i>P/Zn</i>	<i>Fe</i> (µg g ⁻¹ DW)	<i>Mn</i> (µg g ⁻¹ DW)	<i>Cu</i> (µg g ⁻¹ DW)
<i>NPK</i>	4 ± 1 b	3 ± 1 c	4.3 ± 0.1 a	1300	160 ± 22 a	46 ± 2 a	6 ± 1 a
<i>NPK+ZnSO₄</i>	8 ± 1 a	16 ± 3 b	3.5 ± 0.2 b	215	96 ± 4 b	25 ± 3 b	4 ± 1 b
<i>NPK+ZnLS</i>	9 ± 1 a	29 ± 2 a	2.8 ± 0.6 c	100	70 ± 7 c	21 ± 2 b	4 ± 1 b
Maize shoots soil experiment							
	<i>DW (g)</i>	<i>Zn</i> (µg g ⁻¹ DW)	<i>P</i> (mg g ⁻¹ DW)	<i>P/Zn</i>	<i>Fe</i> (µg g ⁻¹ DW)	<i>Mn</i> (µg g ⁻¹ DW)	<i>Cu</i> (µg g ⁻¹ DW)
<i>NPK</i>	5 ± 1 b	10 ± 1 c	1.9 ± 0.1 a	190	56 ± 2 b	38 ± 3 ab	5 ± 1 ns
<i>NPK+ZnSO₄</i>	5 ± 1 b	19 ± 1 b	1.6 ± 0.1 b	85	60 ± 2 b	42 ± 2 a	4 ± 1
<i>NPK+ZnLS</i>	7 ± 1 a	34 ± 2 a	0.8 ± 0.2 c	25	82 ± 2 a	35 ± 2 b	5 ± 1

Moreover the highest Zn concentration in shoots was found in the plants fertilized with NPK+ZnLS, followed by plants treated with NPK+ZnSO₄ and the NPK treated plants. In that case, differences were statistically significant. Plant shoots treated with NPK and NPK+ZnSO₄ showed Zn levels below the critical concentration for maize (20 mg kg⁻¹) (Jones Jr et al., 1991; Marschner, 1995). Dry matter and Zn

concentration in maize shoots followed the same trends observed by Martin-Ortiz et al. (2009) in hydroponic conditions. These authors found that the plants treated with ZnLS in pure hydroponic conditions at pH 8.0 presented higher dry weight and Zn concentration than the ones fertilized with ZnSO_4 at the same conditions. Based on these data, NPK+ ZnSO_4 treatment was expected to show lower efficiency as Zn fertilizer than NPK+ZnLS at our experimental conditions; this fact was confirmed by our results. The best behavior of the NPK+ZnLS as Zn fertilizer could be related with the higher ability of the ZnLS to maintain Zn in solution in comparison with ZnSO_4 .

For all treatments, shoots P content presented the opposite tendency than Zn content (**Table IV-3**). Antagonism between P and Zn has been recognized for many years despite of the mechanism responsible is still not completely understood. Takkar et al. (1976), in a 3-year field experiment conducted with a wheat-maize rotation, concluded that a high P supply could produce severe Zn-deficiency symptoms. Thus an increase on shoots Zn concentration could result in a significant increase of growth and a dilution of the P concentration in plant. Evidences of the Zn-P antagonism was also observed in our perlite experiment. Plants fertilized with NPK presented the highest levels of P and the lowest Zn levels in shoots. Thus, plants treated with NPK+ZnLS showed the lowest levels of P and the highest Zn concentration in shoots. The P-Zn interaction was expressed with the P/Zn ratio at different parts of the maize plant by different authors. According to Takkar et al. (1976) values of P/Zn greater than 150 in 25 day old leaves indicated a severe Zn deficiency. Our results gave P/Zn levels of 1300 in plants treated without any Zn source, 215 in plants treated with NPK+ ZnSO_4 and 100 in plants fertilized with NPK+ZnLS.

Results also showed that the Fe and Mn concentrations decreased as the concentration of Zn increased in shoots (**Table IV-3**), although for Mn the decrease was not significant. These data were similar to those obtained by Adiloglu (2006) in an experiment with maize plants grown in a Zn-deficient soil. The author concluded that Fe, Mn and Cu plant contents decreased as well as the applied Zn concentration increased. It is known that Zn can interact with iron, copper and manganese (Alloway, 2004). The most marked interactions were found between Fe and Zn, which mutually antagonized in translocation (Adriano et al., 1971); and between Mn and Zn, according to the speculative model of Kochian (1993), Mn may influence Zn^{2+} influx into root cells via the divalent cation channel.

At the end of the experiment, Zn retained by the perlite substrate was quantified at different depths (**Figure IV-4**).

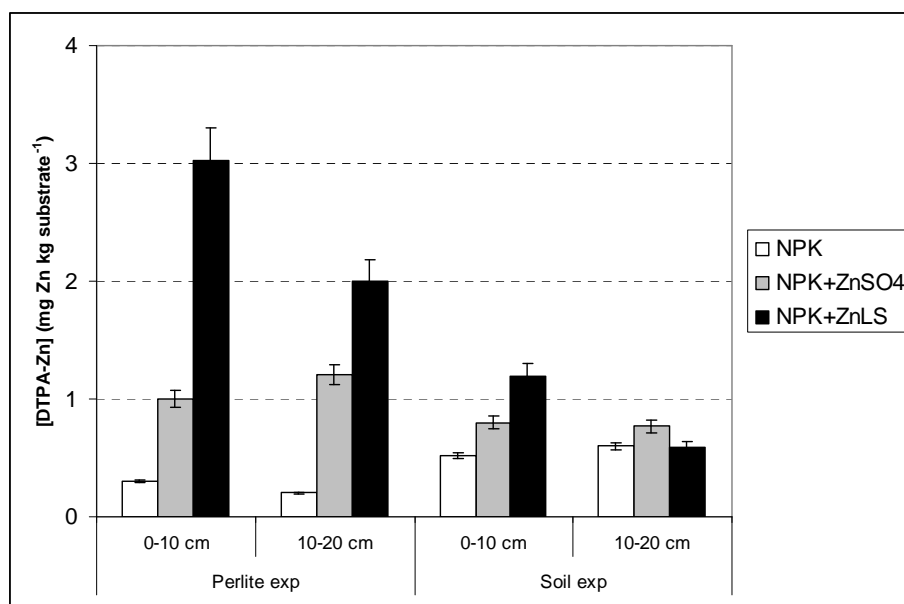


Figure IV-4. Ammonium bicarbonate-DTPA extractable Zn measured at two different depths at the end of the perlite and soil pot experiments. Error bars denote standard errors of the means (n= 4).

The highest AB-DTPA extractable Zn concentration was found in the pots fertilized with NPK+ZnLS (3.0 mg Zn kg⁻¹ of perlite), especially at the upper 0-10 cm layer. This concentration was three times higher than the AB-DTPA Zn concentration found when NPK+ZnSO₄ treatment was applied (1.0 mg Zn kg⁻¹ of perlite). Finally, NPK+ZnLS fertilized pots presented significant differences of available Zn between the upper (3.0 mg Zn kg⁻¹ of perlite) and lower (2.0 mg Zn kg⁻¹ of perlite) layers, while NPK+ZnSO₄ and NPK treatments did not present these differences (**Figure IV-4**). That highest available Zn found at the NPK+ZnLS treatment could be related with the data showed in **Table IV-2**, where the AB-DTPA Zn extracted in NPK+ZnSO₄ columns decreased in comparison with the Zn extracted in the NPK+ZnLS ones. Moreover, when NPK+ZnLS was applied, the available Zn concentration measured at the upper level of the pots was statistically higher than the one at the lower level. The applied Zn scarcely moves throughout the perlite and most of the fertilizer remained at the zone where it was applied.

4-4.- Growth chamber soil experiment

NPK+ZnLS treated plants rendered the shoot highest dry weight in comparison with the other treatments (NPK and NPK+ZnSO₄) (**Table IV-3**). Wang et al. (2004) also studied the effect of ZnLS application on maize under liming soil conditions. The results of their pot experiment indicated that the maize fertilized with ZnLS showed higher biomass than plants fertilized with ZnSO₄.

Concerning to Zn concentration in shoots, the plants with the highest concentration were the ones fertilized with NPK+ZnLS. Plants treated with

NPK+ZnSO₄ showed higher Zn concentration in their shoots than the plants treated with NPK without added Zn. As in the perlite experiment, plants treated with NPK and NPK+ZnSO₄ presented Zn levels below the reference critical concentration (Jones Jr et al., 1991; Marschner, 1995). The results obtained in our experiment were similar to those presented by Rico et al. (1996) in maize plants grown in calcareous soils (pH = 8.5) when urea products coated with ZnLS were supplied. Authors observed that crop yield and the amount of Zn in plants increased when ZnLS fertilizers were applied in comparison with the control treatment (without added Zn). Moreover, Goos et al. (2000) compared the availability of some granular Zn sources (ZnSO₄, and a Zn humate-lignosulfonate [ZnHL]) to maize in a calcareous soil. In these experiments the Zn source was administered without a macronutrient fertilizer. These authors concluded that Zn availability for the plant when the ZnHL complex was applied was greater than when the Zn was supplied as ZnSO₄.

Plants treated only with NPK without added Zn presented the highest P concentration in the shoots in comparison with the plants treated with NPK+ZnSO₄ (**Table IV-3**). However, plants of NPK+ZnLS treatment showed the lowest P concentration in their shoots. Moreover, plants treated with NPK+ZnLS presented higher concentration of Fe and lower concentration of Mn in their shoots than the rest of the treated plants. The Cu concentration in plant shoots did not showed significant differences among treatments.

The AB-DTPA extractable Zn measured in upper and lower levels of the soil after the experiment is shown in the **Figure IV-4**. The highest concentration of AB-DTPA Zn was found in the upper level (0-10 cm) of the NPK+ZnLS treatment pots

(1.2 mg Zn kg⁻¹ of soil). The extractable Zn measured in the NPK+ZnSO₄ pots presented Zn levels half a unit lower than the ones obtained for the NPK+ZnLS pots. The lowest AB-DTPA Zn was extracted at the NPK treatment pots (0.5 mg Zn kg⁻¹ of soil). The NPK+ZnLS treatment was the only one that presented significant differences of available Zn between the upper (1.2 mg Zn kg⁻¹ of soil) and lower levels (0.6 mg Zn kg⁻¹ of soil). It is necessary to take in account that the critical Zn level for corn was established as 0.9 mg Zn kg⁻¹ of soil (Havlin and Soltanpour, 1981). Ammonium bicarbonate – DTPA extractable Zn at the end of the experiment decreased 7 times in soil pots where NPK+ZnLS was added compared to the amount found in the perlite experimental pots. Both, at perlite and soil experiments, the greatest concentration of AB-DTPA Zn was obtained at the upper level of pots where the NPK+ZnLS product was placed (**Figure IV-4**). Gonzalez et al. (2008) compare the Zn mobility of a mixture of Zn chelates (Zn DTPA-HEDTA-EDTA) and a Zn aminelignosulfonate (ZnAML) in a calcareous soil. They found that the amount of Zn leached from the soils treated with ZnAML was very small in comparison with the soils fertilized with the mixture of Zn chelates.

Although the agronomic efficiency (shoots dry weight and Zn concentration) of the products used in our perlite and soil experiments presented a similar trend, higher Zn levels in shoots were found at the soil test for the three treatments. This could be related with the lower P uptake observed at the soil experiment (**Table IV-3**); probably due to the reactions of phosphate fertilizers with some calcareous soil constituents (Samadi and Gilkes, 1999). Thus, P/Zn index decreased in the soil compared with the perlite experiment.

4-5.- Field experiments

Table IV-4 shows the crop yield and the mineral analysis of the maize (grains and shoots) harvested in both field experiments. The amount of grain collected in Quinto experiment did not presented statistical differences among treatments, even though in the plots treated with NPK+ZnLS, 1000 kg ha⁻¹ more of grain were harvested than in the others plots. At this location, plants fertilized with NPK+ZnLS presented the highest Zn concentration in shoots and grains.

Table IV-4. Grain harvested (Mt ha⁻¹±SE) and Zn, Fe, Mn, Cu concentration (µg g⁻¹ DW±SE); Phosphorus concentration (mg g⁻¹ DW±SE); P/Zn ratio in maize shoot and grains in two field experiments. For each column, different letters denote significant differences among the treatments according to Duncan's multiple-range test ($\alpha=0.1$). ns= not significant (n= 4)

Quinto experiment							
<i>Maize shoots</i>							
<i>Treatments</i>	<i>Harvest</i>	<i>Zn</i>	<i>P</i>	<i>P/Zn</i>	<i>Fe</i>	<i>Mn</i>	<i>Cu</i>
<i>NPK</i>		23 ± 2 c	0.20±0.03a	9	116±15b	94 ±7 a	12 ± 1 ns
<i>NPK+ZnSO₄</i>		42 ± 7 b	0.15±0.02b	4	155±19a	84 ±11 a	10 ± 1
<i>NPK+ZnLS</i>		69 ± 5 a	0.12±0.04c	2	150±12a	61 ±9 b	12 ± 1
<i>Maize grains</i>							
<i>NPK</i>	16 ± 1 ns	19 ± 3 b	0.24±0.05ns	13	13 ±1 ns	35 ± 4 a	3 ± 1 ns
<i>NPK+ZnSO₄</i>	16 ± 1	26 ± 4ab	0.22±0.06	10	15 ± 1	13 ± 2 b	2 ± 1
<i>NPK+ZnLS</i>	17 ± 1	30 ± 2 a	0.25 ±0.03	10	16 ± 1	11 ± 2 b	2 ± 1
Barrax experiment							
<i>Maize shoots</i>							
<i>NPK</i>		9 ± 1 c	0.22±0.01ns	24	94 ±14ns	62 ± 8 a	9 ± 1 ns
<i>NPK+ZnSO₄</i>		19 ± 2 b	0.20±0.02	11	90 ± 11	40 ± 1 b	10 ± 3
<i>NPK+ZnLS</i>		28 ± 1 a	0.20±0.01	7	98 ± 10	65 ± 2 a	10 ± 1
<i>Maize grains</i>							
<i>NPK</i>	14 ± 1 b	16 ±1 ns	0.25±0.02ns	16	14 ±1 ns	33 ±1 ns	3 ± 1 ns
<i>NPK+ZnSO₄</i>	14 ± 1 b	17 ± 1	0.26 ±0.03	15	14 ± 1	31 ± 2	3 ± 1
<i>NPK+ZnLS</i>	16 ± 1 a	18 ± 1	0.26 ±0.02	15	14 ± 1	33 ± 1	3 ± 1

Shoot and grains from plots fertilized with NPK+ZnSO₄ showed higher Zn levels than the plants with no added Zn, although the differences were higher in shoot than in grain (**Table IV-4**). Furthermore the highest concentrations of P and

Mn in the maize shoot were found in the plots fertilized with the NPK product with no added Zn.

In Barrax experiment, statistical differences among treatments in the crop yield were found. In plots fertilized with NPK+ZnLS, an increase of crop yield was obtained in comparison with the two other treatments. Moreover, the NPK+ZnLS fertilization provided the highest Zn maize shoots concentration in comparison to NPK and NPK+ZnSO₄ additions (**Table IV-4**).

The P/Zn ratio in shoots seems to be a good index to follow the Zn uptake and its distribution inside the plant (Takkar et al., 1976). This ratio showed drastic changes in treatments at both locations (**Table IV-4**) and was higher in plants treated with NPK and lower for the plants treated with NPK+ZnLS. Phosphorus/Zn ratio was higher in Barrax than in Quinto experiment. As the amount of P added for all treatments in both field experiments was the same, the P/Zn index changes could be mainly attributed to the differences on Zn availability at each experimental plot. Both, the P/Zn ratio in shoots and the shoot Zn content, were suitable indexes of Zn nutrition of maize grown in calcareous soil (Takkar et al., 1976). Our results showed that the P/Zn ratio in shoots should not exceed a value of 10, and shoot Zn content, should be between 20 and 30 mg kg⁻¹ for a good maize production.

Results of field experiments showed an increase of 6% (Quinto experiment) and 12% (Barrax experiment) in maize yields when NPK+ZnLS product was applied to the plots in comparison with NPK+ZnSO₄, and with NPK plots application (**Table IV-4**). No differences in grain yield were obtained between NPK and NPK+ZnSO₄

treatments. However, Malakouti et al. (2005) showed 10% increases in wheat grain yield when a NPK fertilizer with a simultaneous ZnSO_4 addition was applied compared to NPK addition with no added Zn. Shivay et al. (2008) obtained 10% increases of rice grain production when applied a ZnSO_4 -coated urea fertilizer ($1.3 \text{ kg of Zn ha}^{-1}$) in comparison with prilled urea addition. Although results obtained by these authors do not agree with those observed in our experiments, comparisons between experiments are difficult to do because experimental conditions are diverse and the studied crops have different sensitivities to Zn deficiency (Cakmak et al., 1997).

In spite of we did not found literature references of field experiments where a mixed NPK with ZnLS fertilizer was tested, there were numerous studies related to the benefits of Zn fertilization on cereal crops that grown in calcareous soils (Cakmak et al., 1997; Rengel et al., 1999; Bagci et al., 2007). Cakmak (2008) remarked that the application of Zn fertilizers or Zn-enriched NPK fertilizers could offer a good solution in the correction of Zn deficiencies and increase plant growth and yield. This fact was observed in our results, especially when the NPK+ZnLS fertilizer was applied.

Data showed that plants grown in Quinto experiment presented higher Zn concentrations than the plants grown in Barrax experiment for all treatments. Besides plants grown in Quinto presented Zn shoots levels above the critical concentration for all plots (Joner Jr et al., 1991; Marschner, 1995). However, in Barrax only plants fertilized with NPK+ZnLS showed shoot Zn concentration higher than this critical level. This fact was well related with the AB-DTPA extractable Zn

obtained in both soils before the addition of the fertilizers. The Quinto soil had 0.9 mg Zn kg⁻¹ of soil, while the AB-DTPA Zn measured in the soil of Barrax reached levels of 0.4 mg Zn kg⁻¹ of soil. Havlin and Soltanpour (1981) established the critical level for available Zn in soils as 0.9 mg of Zn kg⁻¹ soil. The Zn bioavailability could be influenced by other properties of the soil, as the carbonate and phosphate contents. These compounds were higher in the Barrax than in the Quinto soils and could explain the lowest Zn availability for the crop grown in Barrax (Alloway, 2004). The relative high level of available Zn observed in Quinto soil coupled with its P and carbonate contents and could explain the relative high Zn uptake by maize plants in this soil.

The NPK+ZnLS treatment presented a significant increase of Zn concentration in the grains harvested at the Quinto experiment. This tendency was also observed in the Barrax field. Zinc grain concentration in NPK treatment of Quinto and all treatments in Barrax locations did not reach the meet daily human requirement, established by FAO in at least 20 mg of Zn kg⁻¹ of grain (FAO/WHO, 2004; Pfeiffer and McClafferty, 2007).

5.- Conclusions

In summary, growth chamber perlite and growth chamber soil experiment showed that NPK+ZnLS addition to maize seedlings increased both yield and Zn concentration in shoots in comparison with NPK+ZnSO₄ in calcareous conditions. The Zn incorporated as ZnLS was fairly fixed in the zone where it was applied, avoiding leaching to the environment. In general, in field experiments NPK+ZnLS

application increased the amount of grain and the Zn concentration in the shoots of the plants harvested. A great response to Zn fertilization should be expected in soils with lower Zn content, as occurred in our field work between Barrax (extremely low AB-DTPA Zn concentration) and Quinto (low AB-DTPA Zn concentration) experiment. Results obtained show that the application of NPK+ZnLS in maize crops is an economical and ecological alternative to another Zn sources in calcareous conditions.

**V.- EFFICIENCY OF A ZINC LIGNOSULFONATE
ADHERED TO A NPK FERTILIZER AS ZINC
SOURCE FOR WHEAT (*Triticum aestivum* L.)**

1.- Abstract.....	134
2.- Introduction.....	135
3.- Materials and Methods.....	137
3-1.- Reagents.....	137
3-2.- Preparation of Zn adhered NPK.....	137
3-3.- Growth chamber perlite experiment.....	139
3-4.- Greenhouse soil experiment.....	141
3-5.- Field experiment.....	143
4.- Results and Discussion.....	145
4-1.- Preparation of Zn adhered NPK.....	145
4-2.- Growth chamber perlite experiment.....	147
4-3.- Greenhouse soil experiment.....	150
4-4.- Field experiment.....	154
5.- Conclusions.....	157

1.- Abstract

Perlite, soil and field experiments were carried out to evaluate the efficacy of a NPK fertilizer with a zinc lignosulfonate (ZnLS) adhered as Zn source for wheat (*Triticum aestivum* L.) in comparison with adhered ZnSO₄-NPK application. Thus, NPK 8:24:8 fertilizer was sprayed with ZnLS or ZnSO₄ solutions (0.1% of Zn). The efficiency as Zn fertilizers of these products was evaluated in three biological experiments. In the first and the second assays, wheat plants were grown under controlled conditions (greenhouse and growth chamber) with perlite and a calcareous soil as substrates, respectively. In them NPK, NPK+ZnSO₄ and NPK+ZnLS treatments were evaluated as Zn sources for wheat. Shoot dry matter, Zn, P concentrations and P/Zn ratio shown that NPK+ZnLS was a better Zn source for wheat plants than NPK or NPK+ZnSO₄ under perlite and soil experimental conditions. Zinc determinations in the substrates at the end of experiments also shown that the Zn incorporated as NPK+ZnLS remained in the zone where it was applied. The third experiment was conducted under field conditions, in a Spanish location with calcareous soil with low available Zn. Wheat samples were taken in five growth stages of the crop in order to follow the efficiency of the adhered products as Zn fertilizers. Although in the early stages of the crop NPK+ZnLS emerged as the most efficient source of Zn, at the harvest no significant differences among treatments were found when grain yield or shoot Zn concentration were considered. This behavior could be partially explained by an insufficient Zn supplied to the crop, which was deduced after evaluating shoot Zn and P/Zn indexes. Regardless of NPK+ZnLS showed evidences of being a beneficial Zn source for

wheat crop under calcareous conditions, further field experiment with higher amounts of Zn are necessary to evaluate agronomic potential as Zn fertilizer of the prepared products.

2.- Introduction

Zinc deficiency is by far the most ubiquitous micronutrient deficiency problem in the world as a whole (Alloway, 2008a). Thus, one of the widest ranging abiotic stresses in world agriculture arises from low Zn availability in calcareous soils, particularly in cereals (Singh et al., 2005). High percentage of the soils used for cereal production in the world contain low levels of plant-available Zn, especially in soils with high pH and high CaCO_3 content (Khoshgoftarmanesh et al., 2004), which reduces not only grain yield but also the nutritional quality of the harvested grains (Cakmak et al., 1997; Alvarez and Rico, 2003). Although shown to be relatively tolerant to Zn deficiency, wheat crop (one of the two major staple food crops) are restricted by zinc deficiency over millions of hectares world-wide (Alloway, 2008b). Moreover, large applications of phosphorus fertilizers which are the traditional way to increase wheat crop production can increase the Zn deficiency in plants (Zhu et al., 2001). To prevent and correct Zn deficiency there are numerous Zn products in the Spanish market (De Liñan, 2000-2009). In alkaline or calcareous soils, different authors reported the superiority of some Zn sources to others, so the choice of the Zn fertilizer should depend on the relative agronomic effectiveness of the source applied to a given soil (Alvarez and Gonzalez, 2006).

Sometimes, micronutrients (such as Zn) are applied by mixing with macronutrient fertilizers in order to be used at the same time (Graham, 2008). The

application of micronutrients-enriched NPK fertilizers offers a rapid solution to Zn deficiency (Cakmak, 2008b) and provides a double benefit: increasing grain yield and improving the nutritional quality of the harvested grains (Malakouti, 2007). This has been observed by some authors. Rico et al. (1996) found that urea coated with ZnLS gave rise to a good response by maize in a calcareous soil. On the other hand, Shivay et al. (2008a,b) in two field studies concluded that Zn-enrichment of urea with ZnSO_4 is more effective for increasing the productivity and shoot Zn concentration of wheat and rice crops than their separately application.

The study of the NPK+ZnLS efficiency as Zn fertilizer for maize was already studied by us in two previous works (Martin-Ortiz et al., 2009a,b). In them, both ZnLS applied under hydroponic conditions (Martin-Ortiz et al., 2009a) and NPK+ZnLS applied in different substrates (Martin-Ortiz et al., 2009b) showed better efficiency as Zn source for maize than ZnSO_4 and NPK+ ZnSO_4 . Results obtained showed an increase on shoot dry matter, shoot Zn concentration and grain yield of plants fertilized with NPK+ZnLS in comparison with plants treated with NPK and NPK+ ZnSO_4 . Moreover, this efficiency was positively correlated with the AB-DTPA Zn availability which was measured in the fertilizers prior to their application to maize plants. In the light of the results obtained for maize, in the present work the methodology used to assess the NPK+ZnLS efficiency as Zn fertilizer for wheat was similar but with some differences. The most relevant changes included in the experimental designs of the experiments were carried out on the basis of the different nutritional requirement presented between maize and wheat (Duivenbooden et al., 1995). Thus, both the kind of NPK (8:15:15 for maize; 8:24.8

for wheat) and the amount of Zn adhered in the NPK (0.2% for maize; 0.1% for wheat) were changed. Another change was included at the field experiment sampling. In corn there was a single sampling at the end of the growing season while in wheat samples were taken at five different growth stages.

In brief, the aim of this study is to prepare a homogenous NPK+ZnLS fertilizer and evaluate its effectiveness as a Zn fertilizer for wheat grown under controlled and field conditions.

3.- Materials and Methods

3-1.- Reagents

All reagents used in the experiments were of recognized analytical grade, while water used for the preparation of reagents or standards conforms to EN ISO 3696 (1987), grade I, free of organic contaminants.

3-2.- Preparation of Zn adhered NPK

A ZnLS complex and a sugar-coating ZnSO_4 stock solutions were prepared. Zinc lignosulfonate stock solution (30 mM of Zn) is formed by reacting ZnSO_4 with ammonium fir lignosulfonate ($\text{NH}_4\text{-LS}$; kindly provided by Lignotech Iberica S.A.) on the basis of their maximum Zn complexing capacity (Martin-Ortiz et al., 2009a). As ZnSO_4 has not adherent properties such as the LS (Suzuki et al., 1989) a sugar-

coating solution was prepared. The sugar-coating solution composition was 45% (w/w) sucrose (Panreac, PA), 30% (w/w) ZnSO_4 (Panreac, PA) solution (30 mM of Zn) and 25% (w/w) talc (Panreac, PA) (Ohmori et al., 2007). Total and complexed Zn (Villen et al., 2007) was measured in both solutions (5 replicates) by flame spectroscopic atomic absorption (AAs) (AAnalyst 800, Perkin Elmer). Total Zn concentration of the ZnLS and ZnSO_4 stock solutions were 26 ± 3 and 27 ± 3 mM, respectively.

The coating method used was as follows: 50 kg of NPK 8:24:8 (kindly provided by Fertiberia S.A.) were placed into a 190 L kneading machine. At that time, 25 L of the ZnLS solution were added with a spray nozzle at regular intervals of 100 mL min^{-1} , to avoid the formation of clusters. After this, all samples were air-dried at room temperature during 12 hours. The same procedure was used in the preparation of NPK with ZnSO_4 adhered. As the procedure was repeated three times for each fertilizer, 150 kg of both products were finally obtained.

To determine the final Zn content of the Zn-NPK fertilizers, eight samples of the NPK+ZnLS and the NPK+ ZnSO_4 batches were collected at the end of the process. Total Zn was measured by following the CE 2003/2003 9.1 Method (CE, 2003): five grams of each grinded product were placed into a 250 mL beaker. Fifty mL of 6 M HCl were added in 10 mL portions and then 50 mL of H_2O were added. The beaker was stopped and strongly shaken and filtered through 1238 Whatman filters. The solution was boiled during 30 minutes and cooled. Then, it was transferred to a 500 mL volumetric flask and made up to volume.

Ammonium bicarbonate DTPA extractable Zn, as described by Soltanpour and Workmann (1979) was measured in the Zn-NPK products. Half gram of each sample was placed into a 50 mL beaker where 20 mL of the extracting solution (NH_4HCO_3 1 M + DTPA 0.005 M adjusted to pH 7.6) were added. Solution was stirred during 15 minutes at 180 rpm, filtered through 1238 Whatman filters into a 100 mL volumetric flask and made up to volume. Zinc concentration in both Zn extracts (total and extractable Zn) was measured by AAs.

3-3.- Growth chamber-Perlite experiment

Wheat seeds (*Triticum aestivum* L. cv Perico) were germinated in the dark on moistened filter paper at 30°C. Seedlings were transferred to 12 L container filled with a complete nutrient solution without Zn. The composition of Zn deficient nutrient solution in mM was: 4.0 KNO_3 , 3.0 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2.0 KH_2PO_4 , 1.0 MgSO_4 , 0.5 mM NaCl (Panreac, PA), and microelements in μM : 50 FeEDDHA (as Torneo, Bayer), 25 H_3BO_3 , 5.0 MnSO_4 , 0.5 CuSO_4 , 0.5 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Panreac). This nutrient solution was buffered by a DTPA (Tritiplex V, Merck)-excess solution (Parker et al., 1992) and pH was kept at 8.0 ± 0.3 . The theoretical distribution of the species was tested by VMinteq program (<http://www.lwr.se/English/OurSoftware/vminteq/>).

Riviera 15 L polystyrene pots with 2 L solution compartment were filled up with moistened expanded perlite (Projar, S.A.) about 5 cm before the top of the pot and left to stand during 12 hours. On the top of the moistened perlite, 7 g of each NPK 8:24:8 treatment fertilizers were applied. Treatments consisted of NPK

without added Zn, NPK with adhered ZnSO_4 (NPK+ ZnSO_4) and NPK with adhered ZnLS (NPK+ZnLS). After the treatments addition, pots were filled to the brim and moistened. Seventeen homogeneous wheat seedlings grown in the Zn deficient solution for 4 days were transplanted into each pot. Plants were irrigated with nutrient solution taking into account that N, P and K has already been applied as solid NPK. Chemical composition of this nutrient solution was (mM): 3.0 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1.0 KH_2PO_4 , 1.0 CaSO_4 , 1.0 CaCl_2 , 1.0 K_2SO_4 , 1.0 MgSO_4 , 0.5 NaCl . Microelements in μM were: 50 FeEDDHA, 25 H_3BO_3 , 5.0 MnSO_4 , 0.5 CuSO_4 , 0.5 $\text{MoO}_4(\text{NH}_4)_6$. In addition to this, 0.2 g of solid CaCO_3 were added to the lower compartment of the pots in order to simulate calcareous conditions. Four replicates per treatment were placed in randomized blocks into a growth chamber (Dycometal), with a photoperiod light / night of 16 h / 8 h; temperature 25°C / 18°C and relative humidity 50% / 80%. The radiation flux was $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

After 28 days, shoots were harvested, weighted and thoroughly washed with deionised water. Then, they were dried at 70°C until constant weight to determine dry weight. Zinc, Mn, Cu and Fe concentrations by AAs and phosphorus by a colorimetric method (Kuo, 1996) after dry mineralization of the samples were measured. Wheat seeds were also dry mineralized in order to know their initial micronutrients concentration.

Moreover, at the end of the experiment perlite samples were taken at two different depths (10 and 20 cm) in the pots where AB-DTPA extractable Zn (Soltanpour and Workmann, 1979) was determined.

3-4.- Greenhouse-Soil experiment

The experimental design was similar to the one used for the perlite. Wheat seeds were germinated, and grown without Zn as was explained in the previous section. Riviera 15 L pots were filled with 24 kg of soil/sand 50% (w/w) mixture. Soil tested was obtained (first 20 cm layer) from an agricultural location situated in Villamarciel, Valladolid, Spain (41°31'19" N, 4°53'23" W, alt. 679 m) where also will be conducted the field experiment. Some physicochemical characteristics of this soil are shown in **Table V-1**.

Table V-1. Physicochemical characteristics of the soil used at the soil greenhouse and field experiments.

<i>Sand (g kg⁻¹)</i>	490
<i>Silt (g kg⁻¹)</i>	302
<i>Clay (g kg⁻¹)</i>	208
<i>pH</i>	7.7
<i>OM (%)</i>	1.3
<i>CaCO₃ (%)</i>	12.5
<i>Exchangeable K (cmol_c kg⁻¹)</i>	199
<i>Olsen P (mg kg⁻¹)</i>	32
<i>AB-DTPA Zn (mg kg⁻¹)</i>	0.20
<i>AB-DTPA Fe (mg kg⁻¹)</i>	9.2
<i>AB-DTPA Mn (mg kg⁻¹)</i>	7.2
<i>AB-DTPA Cu (mg kg⁻¹)</i>	1.5

The soil was slightly alkaline with a sandy loam texture and high relative content of P, moderate of CaCO₃ and low of both OM and available Zn. Soil pH was determined at a soil to water ratio of 1:2 (w/v), oxidized soil organic matter (OM),

potassium and exchangeable cations concentrations were measured by following the official methods of the Spanish Agricultural Ministry (Métodos Oficiales de Análisis MARM, 1994). The sand used was a normalized sand (0.5 - 2 mm of diameter), provided by Instituto Eduardo Torroja (CSIC, Spain).

Seven g per pot of NPK, NPK+ZnSO₄ and NPK+ZnLS fertilizers were applied in pots arranged in a randomized complete block design with 4 replicates per treatment. After 4 days of Zn deficiency, 17 wheat seedlings of similar size were transferred to the experimental pots placed at research greenhouse at the Autonomous University of Madrid (between May 12 and June 9, 2007). Climatic conditions were: (day/night) temperature, 25/18 °C, and relative humidity, 50/80 %. Humidity and temperature were maintained by using a fog cooling and humidifier systems. Nutrient solution (same as in the perlite experiment) was added and renewed weekly. The pH of the solution was kept at 8.0, and 0.2 g of solid CaCO₃ were added in order to increase the Zn deficiency. Pots were irrigated with water near the field capacity of the soil when was necessary.

After 4 weeks plant shoots were harvested and handled as in the previous perlite experiment. Available Zn (Soltanpour and Workmann, 1979) at two different depths (10 and 20 cm) of the soil/sand mixture was estimated at the end of the experiment.

3-5.- Field experiment

Field experiment was conducted at Villamarciel (41°31'19" N, 4°53'23" W, altitude 679 m), Valladolid, Spain, in the October 2006-July 2007 cropping season. Soil was used in the greenhouse-soil experiment and its characteristics are shown in **Table V-1**. Climatic data provided by the Spanish National Institute of Meteorology (INM) were (crop cycle averages): temperature 11 °C; maximum temperature 17 °C; minimum temperature 6 °C; relative humidity 72 % and precipitation 38 mm. The experimental design was a split-plot design with four randomized sub-plots per treatment. Sub-plots were 50 m long by 12 m wide (600 m²). Thus, the total area of the experiment was 7200 m² approximately. Each plot was treated with minimum tillage consisted of two tillage operations with a chisel plow and two disking to a depth of 5 cm with 15 cm of separation. Treatments (NPK, NPK+ZnSO₄ and NPK+ZnLS) were applied before sowing. Thirty kilograms of each fertilizer were applied to the 4 sub-plots. Seeds were planted in October, 2007 using a sower machine. Distance between crop rows was 15 cm, and plant population was approximately 250000 seeds per sub-plot. In early spring, nitrogen as urea (60 kg N ha⁻¹) was top-dressed. The experimental plot was border irrigated throughout all the growing season. Farming practices carried out in the experimental area were similar to those done by the farmers of the region.

Five times during the crop cycle of the crop, shoots of 10 plants of each sub-plot were randomized sampled. First sampling was made on at the germination stage (13th of December 2006). Second sampling was made on 22th of February

2007 with plants at seeding stage. The third was made on 29 of March 2007 at tillering stage. Fourth sampling was made on 12th of June 2007 between spike growth and milk stages. Finally, on the harvest (21th of July), in addition to the 10 plants randomized collected, grain yield was measured. Zinc, P, Fe, Mn and Cu concentration were determined at shoots and grain following the same procedure described previously.

4.- Results and Discussion

4-1.- Preparation of Zn adhered NPK

The percentage of extractable Zn in respect to the total Zn for the NPK+ZnLS product was 81% and for the NPK+ZnSO₄ fertilizer was 9% (72% less) (**Table V-2**). These data were similar to those reported by Martin-Ortiz et al. (2009b) for similar products prepared at 500-times lower scale. According to this fact, NPK+ZnSO₄ would present lower agronomic efficiency as Zn fertilizer than the NPK+ZnLS product.

Table V-2. Total and AB-DTPA extracted Zn in the NPK with ZnLS and ZnSO₄ adhered. Data values are means \pm SE of each series of samples. CV= Coefficient of variation.

Series	NPK+ZnLS		NPK+ZnSO ₄	
	Total Zn (g Zn kg ⁻¹)	AB-DTPA Zn (g kg ⁻¹)	Total Zn (g Zn kg ⁻¹)	AB-DTPA Zn (g kg ⁻¹)
1	1.01 \pm 0.11	0.78 \pm 0.05	0.97 \pm 0.08	0.07 \pm 0.02
2	1.01 \pm 0.12	0.83 \pm 0.06	0.88 \pm 0.08	0.08 \pm 0.02
3	0.99 \pm 0.09	0.70 \pm 0.04	1.10 \pm 0.13	0.11 \pm 0.03
4	0.92 \pm 0.07	0.69 \pm 0.08	0.92 \pm 0.06	0.13 \pm 0.03
5	1.00 \pm 0.10	0.84 \pm 0.08	1.15 \pm 0.22	0.05 \pm 0.02
6	0.92 \pm 0.08	0.76 \pm 0.05	0.99 \pm 0.07	0.09 \pm 0.03
7	0.89 \pm 0.07	0.74 \pm 0.04	0.97 \pm 0.05	0.09 \pm 0.04
8	0.99 \pm 0.09	0.94 \pm 0.07	0.95 \pm 0.07	0.08 \pm 0.02
Mean	0.97 \pm 0.05	0.79 \pm 0.08	0.99 \pm 0.09	0.09 \pm 0.02
CV (%)	5	10	9	22

Mortvedt and Giordano (1969) and Mortvedt (1992) pointed out that when Zn sources were incorporated into a NPK fertilizer, the Zn bioavailability may decrease because Zn may react with the components of the macronutrient fertilizer. Zinc included in the NPK as ZnLS could be lesser affected by these reactions probably due to the complexation of the Zn by the LS, which could form a highly cross-linked polymer (Pang et al., 2008) that avoid Zn losses.

Table V-2 also shows the coefficients of variation (CV) for both total and AB-DTPA extractable Zn in fertilizers. The CV informs about the reproducibility rate of the Zn adhering method used in the elaboration of NPK+ZnLS and NPK+ZnSO₄. As the CV of total Zn remains at 10% levels, we conclude that the preparation procedure seems to work to on an adequate degree of homogeneity.

4-2.- Growth chamber-Perlite experiment

Table V-3 shows the dry weight and the micronutrient and phosphorous concentration in shoots of the wheat grown in the perlite substrate. The highest shoot dry weight value was obtained for plants fertilized with NPK+ZnLS, but no statistical differences were observed among treatments (**Table V-3**).

Table V-3. Dry weights ($\text{g} \pm \text{SE}$); Zn, Fe, Mn, Cu concentration ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW} \pm \text{SE}$); Phosphorus concentration ($\text{mg g}^{-1}\text{DW} \pm \text{SE}$) and P/Zn ratio in wheat shoots of perlite and soil under controlled conditions experiments. For each column, different letters denote significant differences among the treatments according to Duncan's multiple-range test ($\alpha=0.05$) ($n=4$). ns= not significant

Perlite							
Treatments	DW (g)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$)	P ($\text{mg g}^{-1}\text{DW}$)	P/Zn	Fe ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$)	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$)
NPK	16 ± 1 ns	10 ± 1 c	1.0 ± 0.2 a	100	48 ± 3 c	86 ± 4 a	7 ± 1 b
NPK+ZnSO ₄	16 ± 1	14 ± 1 b	1.5 ± 0.3 a	107	104 ± 9 a	33 ± 5 b	12 ± 2 a
NPK+ZnLS	18 ± 2	19 ± 2 a	0.5 ± 0.1 b	26	79 ± 5 b	39 ± 3 b	7 ± 1 b
Soil							
NPK	14 ± 1 b	12 ± 2 b	1.2 ± 0.2 a	100	68 ± 2 ns	39 ± 3 ns	5 ± 1 ns
NPK+ZnSO ₄	15 ± 1 b	16 ± 2 b	1.4 ± 0.4 a	88	77 ± 10	50 ± 8	5 ± 1
NPK+ZnLS	19 ± 1 a	22 ± 3 a	0.8 ± 0.2 b	36	62 ± 3	38 ± 4	5 ± 1

In respect to the Zn concentration, plants treated with NPK+ZnLS presented the highest shoot Zn concentration followed by the wheat treated with NPK+ZnSO₄. Plants fertilized with NPK (without any added Zn) presented the lowest Zn concentration in shoots, as expected. The Zn concentration in shoots followed the same trend observed by Martin-Ortiz et al. (2009a) for this crop under hydroponic conditions at pH 8.0. These authors concluded that the worst behavior of the ZnSO₄ to supply Zn to wheat plants could be related to the formation of unavailable Zn

species at alkaline pHs. The formation of Zn insoluble forms when ZnSO_4 is applied to a soil at alkaline conditions (Lindsay, 1979) was mainly responsible of the low efficacy of this salt at calcareous environments, making Zn temporarily unavailable to plants (Yasrebi et al., 1994). This fact is closely related with the low available Zn data obtained for the ZnSO_4 -NPK fertilizers (**Table V-2**). Furthermore, similar results were obtained when comparing NPK+ZnLS and NPK+ ZnSO_4 applications to maize plants grown in perlite (Martin-Ortiz et al., 2009b).

The P and Zn antagonism has been widely investigated (Marschner, 1995), although the specific mechanism involved on it is not completely clear (Zhu et al., 2001). In our experiment the lowest P concentration in shoots was found in plants fertilized with NPK+ZnLS (**Table V-3**). Plants treated with NPK (without any added Zn) and NPK+ ZnSO_4 showed similar P shoot concentration and greater than the one found for the NPK+ZnLS treatment. Zhu et al. (2001) showed that the Zn supply may affect the P uptake efficiency of spring wheat in pot assays. Takkar et al. (1976), in a 3-year field experiment conducted a wheat-maize rotation, concluded that a high P supply could produce severe Zn-deficiency symptoms. Thus an increase on shoots Zn concentration could result in a significant increase of growth and a dilution of the P concentration in plant. Moreover, Takkar et al. (1976) explained that the P-Zn disorder was better related with P/Zn ratio in different parts of the plant than either with the P or Zn content of these tissues separately. In our experiment, the P/Zn ratio was similar in plants fertilized with NPK and NPK+ ZnSO_4 , while it was 4 times lower in NPK+ZnLS treated plants. As in our experiment the P source and amount did not change, the ratio P/Zn could be a good index to predict the Zn availability for the plants.

With respect to Fe, Mn and Cu concentrations measured in the shoot of plants, an interaction between Mn and Zn were found. This interaction could be explained because Mn^{2+} and Zn^{2+} seem to share the same transporter or transporters in the roots (Kochian, 1992; Grusak et al., 1999). The highest concentrations of Fe and Cu were measured in plants fertilized with NPK+ZnSO₄, but this fact did not seem to relate with the Zn nutrition of the wheat plants.

On the other hand, **Figure V-1** shows the Zn concentration extracted at two depths (10 and 20 cm) of the perlite pots at the end of the experiment. The highest AB-DTPA extractable Zn concentration was found in the first 10 cm of pots fertilized with NPK+ZnLS (2.0 mg Zn kg⁻¹ of perlite).

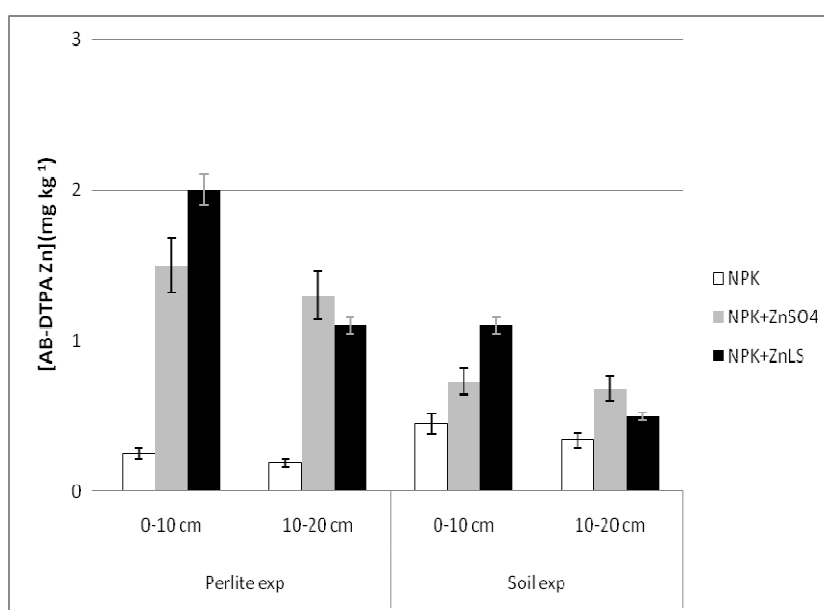


Figure V-1. Ammonium bicarbonate-DTPA extractable Zn measured at two different depths at the end of the perlite and soil pot under controlled conditions experiments. Error bars denote standard errors of the means (n= 4).

When NPK+ZnSO₄ and NPK treatments were applied AB-DTPA Zn measured in the first 10 cm of the pots was 1.5 and 0.2 mg Zn kg⁻¹ respectively. For the NPK+ZnLS treatment the highest AB-DTPA Zn concentration was measured in the first 10 cm of the perlite (**Figure V-1**), but for the NPK+ZnSO₄ the Zn was distributed throughout the pot. It should be remembered that fertilizers were placed precisely at that depth (10 cm) before start of the experiment. Only in pots where the NPK+ZnLS fertilizer was added statically differences of available Zn between the upper (2.0 mg Zn kg⁻¹ of perlite) and lower (1.1 mg Zn kg⁻¹ of perlite) depths of the perlite were found. These data confirm previous results which showed a 98% of Zn retention in the first 5 cm of perlite leaching column when it was added as NPK+ZnLS (Martin-Ortiz et al., 2009b). The fact that the Zn applied as ZnLS remained at the same depth where it was placed was already observed by other authors in soil leaching experiments (Alvarez et al., 1996; Alvarez et al., 2001; Gangloff et al., 2006). Zinc measured when NPK (without added Zn) was applied (\approx 0.2 mg kg⁻¹) could proceed from the raw materials of fertilizer (Senesi et al., 1999). Specifically, in the NPK used for these experiments, 40 mg of total Zn kg⁻¹ of fertilizer were assessed.

4-3.- Greenhouse-Soil experiment

Shoot dry matter and Zn concentration was significantly higher in plants treated with NPK+ZnLS compared to plants fertilized with NPK or NPK+ZnSO₄ (**Table V-3**). Rico et al. (1995; 1996) observed a similar behavior in maize fertilized with ZnLS coated urea. These authors prepared a coating urea fertilizer with a mixture of rosins, tricalcium phosphate and ZnLS. The addition of this fertilizer to a

maize crop under calcareous soil-greenhouse conditions increased the biomass as well as the Zn concentration of the shoots in comparison with urea without added Zn. Also for maize, we observed a good response to the NPK fertilizer (8:15:15) with adhered ZnLS fertilization against the NPK+ZnSO₄ and the NPK without added Zn application in a calcareous soil experiment (Martin-Ortiz et al., 2009b).

In both perlite and soil experiments, NPK+ZnLS application increased shoot dry matter and Zn concentration to a greater extent than NPK+ZnSO₄ (**Table V-3**). It is assumed by some researchers, that organic sources of Zn are more effective as Zn fertilizers than inorganic ones (Hergert et al., 1984; Mortvedt and Gilkes, 1993). Goos et al. (2000) showed a higher efficiency of a zinc humate-lignosulfonate complex (ZnHL) than a ZnSO₄ application as Zn source to maize grown in a calcareous soil. Ozkutlu et al. (2006) found that a zinc humate application increased soybean shoots dry matter and Zn concentration more than ZnSO₄ under calcareous conditions.

One possible explanation of the lower ZnSO₄ efficiency compared to ZnLS as Zn fertilizer under calcareous conditions could be the decrease of Zn availability of ZnSO₄ when pH and CaCO₃ content of the soil increase (Lindsay, 1979; Modaihsh, 1990). Previous works indicate that the behaviour of Zn fertilizers, when mixed with soil, is clearly influenced by soil pH, as well as the presence and amount of CaCO₃ in the soil (Alvarez et al., 2001; Obrador et al., 2003). After its application, the Zn fertilizer reacts with the soil and was transformed into more stable compounds (as oxides, hydroxides and oxyhydroxides) which are less available to plants. These reactions are likely to be rapid enough that they may limit the effectiveness of

soluble inorganic Zn fertilizers (Ma and Uren, 2006). Thus, the chemical properties of Zn fertilizers that are deemed ideal for non-calcareous should be revised for highly calcareous soils (Slaton et al., 2005).

Values of P/Zn ratio in shoot of plants treated with NPK+ZnLS were below to 40 and agree with the data observed in the perlite experiment. As in the previous perlite assay, the lowest shoot P concentration was measured in plants fertilized with NPK+ZnLS moreover these plants presented the highest shoot Zn concentration (**Table V-3**). This fact was already observed at the perlite experiment and is considered an evidence of the P-Zn interaction (Takkar et al., 1976; Zhu et al., 2001). Taking into account some parameters measured in plants (as shoots biomass growth and Zn concentration) P/Zn ratio could be a suitable index to assess the efficiency as Zn fertilizers of Zn-NPK products. Thus, the highest efficiency corresponds to the lowest P/Zn ratio (**Table V-3**) that corresponded to plants fertilized with NPK+ZnLS. As in the perlite assay, the NPK and NPK+ZnSO₄ P/Zn ratios were similar. **Table V-3** also shows that the treatments application did not significantly affect the Fe, Mn and Cu uptake by the crop in the greenhouse-soil experiment.

On the other hand, available Zn in soil at two different depths (10 and 20 cm) of the experimental pots was measured when plant material was removed (**Figure V-1**). As in the perlite experiment, highest available Zn was found at the upper zone (10 cm) of the soil-pots where plants were treated with NPK+ZnLS (1.1 mg Zn kg⁻¹ of soil). Furthermore only when NPK+ZnLS was applied differences in AB-DTPA Zn concentrations between upper and lower depths (1.1 and 0.5 mg Zn kg⁻¹ of soil,

respectively) were observed. These results could indicate the retention of the Zn added as ZnLS in the area where NPK+ZnLS was applied (first 5 cm of the pots) and are in accordance with those observed in the perlite experiment. Alvarez et al. (1996; 2001) pointed out the possible relationship between the low mobility of Zn with the adsorption of ZnLS to some soil components. In the same way Alvarez and Rico (2003) and Gonzalez et al. (2008) observed that when liquid ZnLS was added in calcareous soils the amount of Zn leached was very small. Authors attributed this retention, among other reasons, to the low stability of the Zn complexes. Zinc mobilization to the low level of the experimental pots was found for the NPK+ZnSO₄ treatment (**Figure V-1**). This result agrees with Singh (1974) that observed a Zn movement to a lower depth in calcareous and acid soils when ZnSO₄ was applied. In soil pots where NPK without any Zn source was added, residual concentrations of Zn (≈ 0.4 mg of Zn kg⁻¹) were measured. The origin of this Zn could be the raw materials of fertilizer, which contains 40 mg of total Zn kg⁻¹, or from the Zn present in the soil (**Table V-1**).

4-4.- Field experiment

Data obtained from the wheat grown at the field experiment (**Figure V-2a**) shows that plants treated with NPK+ZnLS presented the highest Zn concentration in shoots throughout all the growing crop cycle. Plants treated with NPK+ZnSO₄ and NPK presented a similar trend after week 20 of the crop cycle. Shoot of plants showed Zn concentration levels from 55 (early stages) to 18 mg kg⁻¹ (at final stages of growth).

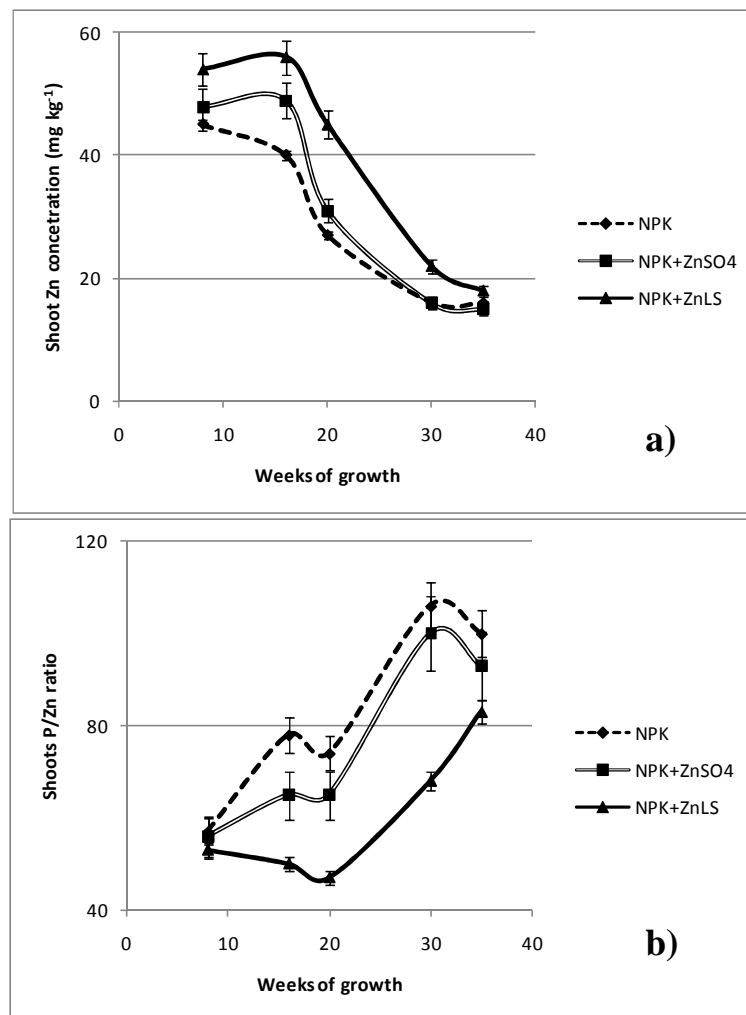


Figure V-2. a) Zinc concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) and b) P/Zn ratio of wheat shoots at different growth stages in field experiment. Error bars denote standard errors of the means ($n=4$).

The highest concentration of Zn in shoots was measured at the early stages of the growing cycle, probably due to base dressing (just before the crop sowing) application of the fertilizers. Differences in shoot Zn concentration among plants treated with NPK+ZnLS and plants of the other treatments decreased as the weeks of growth advanced. Generally with the increasing in plant age, Zn shoot concentration decreased for all treatments due to a dilution effect (Cakmak et al., 1997).

At the last two samples (milk and harvest stages), plants treated with NPK+ZnLS shown slightly higher Zn concentration compared to plants treated with NPK and NPK+ZnSO₄ (**Figure V-2a**). Zinc concentration for all the treatments was near or below the critical Zn concentration proposed by Jones Jr. et al. (1991) (20 mg Zn kg⁻¹) and by Singh et al. (2005) (25 mg Zn kg⁻¹) for wheat (*Triticum aestivum* L.) at this stages of growth. These data indicated a low response of the crop to NPK+ZnSO₄ and NPK+ZnLS fertilizer application at the field conditions.

In addition, as mentioned before, no significant differences among treatments were found for grain yields (around 9600 kg grain ha⁻¹), or for grain Zn concentration (approximately 16 mg Zn kg⁻¹). These results did not follow the trend observed by other authors at field experiments; in which a positive response of wheat to Zn fertilization with ZnSO₄ in Zn-deficient calcareous soils were observed (Cakmak et al., 1996; Kalayci et al., 1999; Khoshgoftarmanesh et al., 2004; Bagci et al., 2007). This could be due to the higher Zn levels applied by these authors (23- 40 kg Zn ha⁻¹), while in our experimental plots only 1 kg Zn ha⁻¹ was added. Furthermore, as in this work the Zn sources (both ZnSO₄ and ZnLS) were adhered to

NPK, the micronutrient could interact with the materials of the NPK fertilizer thereby reducing its effectiveness as Zn fertilizer (Mortvedt, 1985). Although, Shivay et al. (2008a,b) showed that the rice and wheat response to ZnSO_4 -coated urea application was also higher than to the same amount of ZnSO_4 applied separately on calcareous soils.

Zinc concentrations in wheat shoots at the initial stages of the field assay (40-55 mg Zn kg⁻¹ dry weight) were twice as the ones found at the greenhouse-soil experiment (12-21 mg Zn kg⁻¹ dry weight). These disparities of results could be partly explained because of the differences between greenhouse and field experimental conditions. Thus, in the greenhouse test: wheat plants were transferred after an induced Zn-deficiency period, the soil was mixed with sand, and buffer nutrient solution (pH 8.0) with solid CaCO_3 was added to the lower compartment of the experimental pots. These growth conditions could influence on the relative low Zn concentration measured in greenhouse-grown wheat plants. In brief, and taking into account both the shoot zinc concentration and the grain yield, it would be necessary to increase the amount of Zn incorporated into the NPK+ ZnSO_4 and the NPK+ZnLS fertilizers in order to compare their efficiency as a Zn sources.

As was previously said in perlite and soil experiments, P/Zn ratio can also provide information about the effectiveness of the Zn-NPK products. Thus, as the P applied in all treatments was the same, the P/Zn ratio variation is related to the available Zn by plants. The lowest P/Zn ratio always was measured in shoots of plants treated with NPK+ZnLS (**Figure V-2b**); that could indicate a higher efficiency

of this product as a fertilizer Zn compared to NPK+ZnSO₄. Shoot P/Zn ratio measured in plants treated with NPK+ZnLS at first growth stages (≈ 50) was higher than P/Zn ratio measured in these plants at the perlite and soil experiments under controlled conditions (30-40) (**Table V-3**). Furthermore, there was a large increase of these indexes after the 20th week of growth (near 80) of field experiment. This would be related with the highest P availability in the soil of field assay (high P Olsen level increased by the NPK application).

5.- Conclusions

According to the AB-DTPA Zn values, the NPK+ZnLS fertilizer would present a better efficiency than NPK+ZnSO₄ one. This fact was confirmed by the results obtained in perlite and soil experiments under controlled conditions. In them, NPK+ZnLS application increased wheat shoots growth and Zn concentration compared to plants fertilized with NPK+ZnSO₄ and NPK without added Zn. On the other hand, when NPK+ZnLS was applied in field experiments its efficacy decreased during the growth cycle. Probably a higher dose of Zn or a higher application of the fertilizer was required. The increase of P availability in experimental field conditions also supports this fact. Thus, despite of the differences in Zn shoots concentration at the initial stages of the growth cycle, we did not observe significant differences in grain harvest among treatments.

Although further field experiment with higher amounts of Zn or for other crops are necessary to evaluate the agronomic potential of NPK+ZnLS as Zn source, this fertilizer showed evidences of being a useful source for wheat in calcareous soils.

**VI.- EFICACIA DE UN FERTILIZANTE NPK CON
LIGNOSULFONATO DE MANGANESO ADHERIDO
COMO FUENTE DE Mn PARA TRIGO (*Triticum
aestivum* L.) Y MAÍZ (*Zea mays* L.)**

1.- Resumen.....	162
2.- Introducción.....	163
3.- Materiales y Métodos.....	166
3-1.- Preparación del producto MnLS.....	167
3-2.- Cultivos hidropónicos de trigo y maíz a pH 8,5.....	168
3-3.- Preparación productos NPK+MnLS y NPK+MnSO ₄	170
3-4.- Cultivos trigo en perlita.....	171
4.- Resultados y Discusión.....	173
4-1.- Preparación del producto MnLS.....	173
4-2.- Evaluación del MnLS como fuente de Mn para trigo y maíz en cultivos hidropónicos a pH 8,5.....	174
4-3.- Mn total y disponible en productos NPK+MnLS y NPK+MnSO ₄	180
4-4.- Evaluación del NPK+MnLS (0,1 y 1,0% Mn) como fuente de Mn para trigo cultivado en perlita.....	182
5.- Conclusiones.....	186

1.- Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de un fertilizante NPK con lignosulfonato de Mn (NPK+MnLS) adherido, como fuente de Mn para plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y maíz (*Zea mays* L.). Para ello, se seleccionó un lignosulfonato amónico de eucalipto y se determinó su máxima capacidad para complejar Mn. Atendiendo a esta capacidad de complejación se preparó un producto MnLS (5 μ M), cuya eficacia para suministrar Mn a las raíces de trigo y maíz fue comparada frente a la del MnSO_4 (5 μ M) en un cultivo hidropónico puro. Las plantas de trigo con deficiencia de Mn presentaron mayor respuesta a la fertilización con Mn que las de maíz, posiblemente debido a que el trigo tiene mayor sensibilidad a la deficiencia de este micronutriente. Debido a esto, se utilizó el trigo para evaluar la eficacia como fertilizantes de Mn de un NPK (8:24:8) con MnLS y con MnSO_4 (en dos dosis 0,1 y 1% Mn) adheridos en dos ensayos sobre perlita. Al aplicar el Mn en una dosis de 0,1% en el NPK, los mayores pesos secos y concentraciones de Mn en la parte aérea se obtuvieron en plantas fertilizadas con NPK+MnLS, frente a las fertilizadas con NPK+ MnSO_4 . Sin embargo, en el ensayo donde la dosis aumentó hasta el 1,0%, no se observaron diferencias significativas en peso seco y concentración de elemento en parte aérea entre las plantas fertilizadas con NPK+MnLS y NPK+ MnSO_4 . A pesar de que sería necesaria una optimización de los dispositivos experimentales empleados; el producto NPK con MnLS adherido en una dosis cercana al 0,1% de Mn mostró evidencias de ser una buena fuente de Mn para trigo y maíz en las condiciones de ensayo planteadas.

2.- Introducción

La deficiencia de manganeso (Mn) es un problema agronómico ampliamente distribuido en todo el mundo (Kabata-Pendias y Pendias, 1992) y comúnmente detectado en cereales (Sinclair y Edwards, 2008). Esta deficiencia, junto con la de otros micronutrientes, contribuye a que aproximadamente el 50% de la población mundial sufra algún tipo de desorden alimentario causado por la deficiencia de estos elementos esenciales (Cakmak, 2002).

La química del Mn en suelos es compleja ya que este elemento puede encontrarse en distintas especies principalmente en tres estados de oxidación: Mn (II), Mn (III) y Mn (IV) (Lindsay, 1979). En función del medio donde es aplicado, el Mn^{2+} puede oxidarse rápidamente a Mn^{3+} y también a Mn^{4+} (Mortvedt, 1994) una especie insoluble en la disolución el suelo y por lo tanto escasamente disponible para los cultivos (László, 2008). Junto con su estado de oxidación, el pH también influye en la disponibilidad del elemento en suelos (Jiang, 2006). Al igual que ocurre con el Zn y el Fe, el Mn se encuentra en formas poco disponibles para los cultivos en suelos calcáreos y/o con valores de pH superiores a 7,5 (Moraghan y Mascagni, 1991). Finalmente, otro factor que influye en la deficiencia de Mn en un cultivo es la presencia de Fe, debido a que ambos elementos pueden ser antagonistas en planta (Marschner, 1995). Así, existen numerosas referencias a trabajos donde se estudia la relación Fe-Mn en cultivos como índice para detectar clorosis de manera más eficaz (Knezek y Greinert, 1971; Raven, 1990; Adriano, 2001; Ghasemi-Fasei y Ronaghi, 2008).

Si se atiende a la deficiencia de Mn en cereales, es importante señalar que existen especies (o variedades) de estos cultivos con la capacidad de desarrollarse en suelos con un nivel bajo de Mn disponible. A estos cultivos se les denomina “eficientes” o “Mn-eficientes” (Graham, 1984). Al contrario, un cultivo con una baja eficiencia de Mn se considera “sensible” a la falta de dicho elemento (Martens y Westermann, 1991). Dentro de los cereales, existe disparidad en cuanto a sensibilidad a la deficiencia de Mn: mientras que el trigo presenta una sensibilidad elevada a esta deficiencia, un cultivo de maíz puede desarrollarse en un suelo con deficiencia de Mn mientras esta no sea muy severa (Martens y Westermann, 1991).

Para reducir la deficiencia de Mn, principalmente en cultivos y/o variedades no eficientes, se aplican numerosos tipos de fertilizantes. Los más comunes son sales inorgánicas (MnSO_4 , MnO , MnCl_2) y quelatos sintéticos (MnEDTA) (Martens y Westermann, 1991). Existen numerosas referencias respecto a la aplicación de diferentes fuentes de Mn a cultivos. Así, Randall y col. (1975) observaron un aumento en la calidad y cantidad de la cosecha de un cultivo de soja (*Glycine max* L. Merrill) al realizar aplicaciones foliares y en suelo con MnSO_4 y MnEDTA . Mascagni Jr y Cox (1984) también observaron un incremento en la cosecha de maíz, cultivado en un suelo deficiente en Mn, al realizar una aplicación foliar con MnSO_4 . Aunque, como ya hemos indicado, la aplicación de Mn está generalizada para numerosos cultivos de cereal, quizás donde más se ha estudiado la incidencia de la nutrición de este elemento es en el trigo (Ohki, 1984). Ohki (1984) estableció entre 13 – 82 mg Mn kg^{-1} peso seco el nivel crítico de Mn en hoja de trigo, en función de la hoja muestreada. También se han investigado otros aspectos de la nutrición del Mn en trigo como: la influencia de la concentración de Mn inicial en semilla en el

crecimiento del cultivo en un suelo deficiente en Mn (Marcar y Graham, 1986); el transporte del Mn desde la raíz a la hojas de plantas jóvenes (Page y Feller, 2005) y la sensibilidad a la deficiencia de Mn que presentan distintas variedades (Sadana y col., 2005; Jiang, 2006).

La cantidad y el tipo del fertilizante de Mn empleado dependen de las características del suelo donde se adiciona. De este modo, los productos aplicados tradicionalmente en suelos calcáreos van a permanecer durante poco tiempo en la disolución del suelo, debido a la formación de compuestos insolubles (Lindsay, 1991). Una alternativa al uso de sales inorgánicas y de quelatos sintéticos, siendo estos últimos productos generalmente utilizados en cultivos con alto valor añadido, pueden ser los complejos. El lignosulfonato de manganeso (MnLS) es un complejo formado por la reacción de un residuo de la industria papelera, el lignosulfonato (LS) y MnSO_4 . Si bien no se han encontrado referencias de la eficiencia de MnLS como fuente de Mn, si hemos comprobado que la aplicación del complejo de LS con otros metales como el Zn reporta ventajas frente a la aplicación de ZnSO_4 (Martín-Ortiz y col., 2009a,b). Estos resultados permiten suponer que la aplicación de MnLS puede mejorar la respuesta de cultivos de trigo y maíz a la deficiencia de este elemento frente a la aplicación de MnSO_4 .

Por otro lado, la aplicación de Mn y otros micronutrientes en fertilizantes de macronutrientes comerciales es una práctica extendida en la fabricación de insumos agrícolas debido a los beneficios económicos que esta acción reporta (Hettiarachchi y col., 2007). Algunos autores, como Cakmak (2008) y Malakouti (2008), no sólo observan ventajas económicas, sino también agronómicas en la aplicación de

fertilizantes NPK enriquecidos con micronutrientes, al encontrar una mejor respuesta a la aplicación de micronutrientes cuando se adicionaron de forma conjunta que por separado.

Teniendo en cuenta lo comentado previamente, el objetivo de este trabajo fue preparar un producto NPK con MnLS adherido y evaluar su eficacia como fuente de Mn para plantas de trigo y maíz.

3.- Materiales y Métodos

Los pasos seguidos para alcanzar el objetivo planteado fueron los siguientes. Primero se preparó un producto MnLS en función de la máxima capacidad del LS para complejar Mn. Este producto fue evaluado como fuente de Mn en cultivos hidropónicos puros de trigo y maíz a pH básico (8,5). Una vez estudiada la eficiencia del complejo MnLS, se procedió a preparar un fertilizante NPK (8:24:8) con MnLS adherido (NPK+MnLS), con objeto de disponer de productos homogéneos con un porcentaje de Mn de 0,1% y 1,0%. La evaluación de la eficacia de estos productos como fertilizantes de Mn se llevó cabo en un ensayo con trigo cultivado en perlita, comparando dicha eficacia con dos productos NPK+MnSO₄ (0,1 y 1,0% de Mn).

La metodología empleada en la evaluación de esos productos fue similar a la que utilizamos en trabajos anteriores (Martin-Ortiz y col., 2009a,b) para estimar la eficacia de un producto NPK+ZnLS como fuente de Zn.

3-1.- Preparación del producto MnLS

El LS empleado en este ensayo fue una sal amónica ($\text{NH}_4\text{-LS}$) procedente de eucalipto. Este LS fue suministrado por la empresa Lignotech Ibérica S.A. (pH 8,7; S total 7,1 %; grupos carboxílicos 4,8 % y grupos fenólicos 1,1 %).

Se determinó, la máxima capacidad para complejar Mn en la estructura del LS utilizando el método de la AOAC modificado propuesto por Villén y col. (2007). De este modo, se prepararon 500 mL de una disolución 100 g LS L^{-1} . A 8 vasos de polietileno de 60 mL, con 20 mL de esta disolución, se adicionaron 0; 1,5; 4,5; 6,0; 7,5; 9,0; 12,0; y 15,0 mL de una disolución de MnSO_4 (100 g L^{-1} , producto PA de Panreac) y dos gotas de H_2O_2 (33% PA de Panreac). Después de las adiciones, el pH de todas las disoluciones se ajustó a pH 9,0 con NaOH 0,5 M (PA de Panreac). Las muestras, a pH 9,0, se taparon y preservaron de la luz durante 12 horas. Pasado este tiempo las muestras se reajustaron a pH 9,0 y se transfirieron a matraces de 100 mL donde fueron enrasadas con agua milliQ (ISO 3696, 1987). Las muestras donde apareció precipitado se sometieron a centrifugación durante 10 minutos a 7500 rpm y se filtraron con filtros Millipore de 0,45 μm . La disolución resultante fue tratada siguiendo el método 9.3 del Reglamento Europeo EC 2003 (2003), para eliminar interferencias en la medida de Mn producidas por la presencia de materia orgánica. Dicha medida de Mn se realizó mediante espectroscopia de absorción atómica (EAA, AAnalyst 800 Perkin Elmer).

Teniendo en cuenta la máxima capacidad de complejación del LS se preparó una disolución 5 μ M de MnLS, mezclando las cantidades apropiadas de NH₄-LS y MnSO₄•7H₂O.

3-2.- Cultivos hidropónicos de trigo y maíz a pH 8,5

Se germinaron semillas de trigo (*Triticum aestivum* L. cv Perico) y maíz (*Zea mays* L. cv Agrano C500) siguiendo un procedimiento similar al empleado en ensayos anteriores (Apartados III, IV, V). En estas semillas también se determinó la concentración de Mn (mineralización vía seca) para conocer el aporte inicial de elemento proporcionado por las mismas.

Una vez germinadas, a las plántulas se les indujo deficiencia de Mn aplicando una disolución nutritiva sin Mn, ajustada a pH 8,5 con NaOH (0,5 M) y con exceso de DTPA⁻⁵ (100 μ M, Tritiplex V, Merck) para asegurar la deficiencia de Mn (Parker et al., 1992). La composición de la disolución nutritiva aplicada fue la siguiente: Macronutrientes (mM): 4,0 KNO₃, 3,0 Ca(NO₃)₂, 2,0 KH₂PO₄, 1,0 MgSO₄, 0,5 mM NaCl. Microelementos (μ M): 50 FeEDDHA (Torneo, Bayer), 25 H₃BO₃, 0,5 ZnSO₄, 0,5 CuSO₄, 0,5 (NH₄)₆Mo₇O₂₄ (todas las sales PA, Panreac). La especiación teórica de la disolución nutritiva se ajustó utilizando el programa informático de especiación química VisualMinteq.

Pasados 4 días del período de carencia, 8 plántulas de trigo y 5 de maíz se trasplantaron a tiestos de plástico opacas de 3 L, con un aireación. En estas tarteras se aplicaron los tratamientos consistentes en tres disoluciones nutritivas con

diferentes fuentes de Mn. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: un Control sin Mn añadido (0 Mn), un tratamiento con adición de MnSO_4 5 μM (PA, Panreac) (MnSO_4) y uno al que le añadimos MnLS 5 μM (MnLS). La disolución nutritiva de los tratamientos tuvo la misma composición que la disolución de carencia, con la salvedad de las fuentes de Mn aplicadas en cada uno de ellos y la retirada del reactivo H_5DTPA . Además de esto, en cada dispositivo experimental se añadieron 0,1 g L^{-1} de CaCO_3 sólido (PA, Panreac) para simular condiciones calcáreas. La disolución nutritiva aplicada se repuso semanalmente. El ensayo se llevó a cabo en una cámara de cultivo (Dycometal) con las siguientes condiciones climáticas (día/noche): fotoperíodo (16/8 h), temperatura (25/18 °C), humedad relativa (30/50 %).

Tras dos semanas se muestreó la parte aérea y la raíz de las plantas de maíz, mientras que las de trigo se muestrearon pasadas 3 semanas. Al material vegetal recolectado se le realizaron las siguientes determinaciones: peso fresco, peso seco, concentración de Zn, Mn, Fe y Cu (EAA).

Las diferencias de cada determinación, entre tratamientos fueron analizadas por medio de un ANOVA monofactorial, seguido de una comparación post-hoc de medias usando el test de Duncan ($\alpha = 0,05$). Para esto se empleó el programa informático estadístico SPSS 14.0.

3-3.- Preparación productos NPK+MnLS y NPK+MnSO₄

Para preparar los productos NPK con Mn adherido (0,1 y 1,0%) y en base a la máxima capacidad de complejación de Mn en el LS, se prepararon 50 mL de dos disoluciones MnLS: 36 μ M y 0,33 mM, mezclando las cantidades de NH₄LS y MnSO₄·7H₂O necesarias. Del mismo modo se prepararon otras dos disoluciones de MnSO₄·7H₂O del mismo volumen y concentraciones que las anteriores. En todas las disoluciones preparadas se determinó tanto el Mn total como el complejo mediante EAA.

El proceso de incorporación de las disoluciones de Mn al NPK fue el siguiente: 100 g de NPK 8:24:8 (suministrado por Fertiberia S.A.) se introdujeron en el tambor (1,0 kg de capacidad) de una mezcladora horizontal con plano inclinado (MRPI-06 SBS). Al fertilizante NPK se le aplicaron las disoluciones de Mn mediante un pulverizador, a intervalos regulares de 1,0 mL con un receso de 2 minutos entre cada adición para evitar el apelmazamiento del producto. Así, los fertilizantes preparados fueron: NPK+MnLS 0,1%; NPK+MnLS 1,0%; NPK+ MnSO₄ 0,1%; NPK+MnSO₄ 1,0%. Una vez pulverizadas las disoluciones, los productos se depositaron en un papel de filtro y terminaron de secar secaron a temperatura ambiente durante 12 h.

Una vez secos se determinó el Mn total siguiendo el método 9.1 CE 2003/2003 propuesto por la UE, y el Mn disponible, siguiendo el método propuesto por Soltanpour y Workman (1979) en los NPK preparados. Ambas fracciones de Mn

(total y extraído por AB-DTPA) se midieron en EAA. Para realizar el análisis estadístico se dispuso de 3 repeticiones de cada extracto y fertilizante.

3-4.- Cultivos trigo en perlita

Semillas de trigo (*Triticum aestivum* L. cv Perico) se germinaron y a las plántulas obtenidas se les sometió a carencia de Mn siguiendo la metodología descrita en el ensayo hidropónico. Después del período de carencia de Mn, se procedió a trasplantar cuatro plántulas homogéneas de trigo a tiestos Riviera con capacidad de 5,5 L y con un depósito para disolución nutritiva de 0,5 L. Estos tiestos se rellenaron con perlita previamente humedecida hasta 2/3 de su capacidad. Se aplicaron 7 g de los fertilizantes preparados en el apartado anterior (3 replicados por tratamiento dispuestos al azar): NPK, NPK+MnSO₄ (0,1%), NPK+MnLS (0,1%), NPK+MnSO₄ (1,0%) y NPK+MnLS (1,0%). Las dosis 0,1% y 1,0% de Mn en los NPK equivalen 1 y 10 kg de Mn ha⁻¹ y han sido seleccionadas a partir de la bibliografía (Randall y col., 1975; Nayyar y col., 1985).

Una vez aplicado el fertilizante, cada tiesto se rellenó hasta el borde superior con perlita humedecida. Las plantas se regaron semanalmente (adicionando la disolución al depósito de los tiestos Riviera) con una disolución nutritiva con una concentración de N, P y K ajustada en función de la cantidad de estos elementos aplicada mediante el fertilizante NPK. La composición química de la misma fue: macronutrientes en mM; 3,0 Ca(NO₃)₂, 2,0 K₂SO₄, 2,0 MgSO₄, 1,0 K₂HPO₄, 1,0 CaSO₄ y 0,5 mM NaCl (PA, Panreac). Micronutrientes en μM: 50 FeEDDHA (Torneo, Bayer), 25 H₃BO₃, 1,5 ZnSO₄, 0,5 CuSO₄, 0,5 (NH₄)₆Mo₇O₂₄ (PA, Panreac). Al igual que en el

ensayo hidropónico, para simular condiciones calcáreas, la disolución se ajustó a pH 8,5 (con NaOH 0,5 M) y en el depósito se añadió 0,1 g L⁻¹ de CaCO₃ sólido (PA, Panreac).

Pasadas 4 semanas se procedió al muestreo de la parte aérea de las plantas determinando: peso fresco y seco, concentración de Mn, Fe, Zn y Cu (EAA). Al retirar el material vegetal, se tomaron muestras de perlita a 10 y 20 cm de profundidad, donde se midió el Mn disponible remanente (Soltanpour y Workman, 1979).

4.- Resultados y Discusión

4-1.- Preparación del producto MnLS

La capacidad para complejar Mn del LS se determinó mediante el método de la AOAC modificado añadiendo cantidades de Mn sucesivas. En un primer segmento la concentración de Mn medido aumentó a medida que aumentaba la adición del mismo al LS. Pasado el segmento de subida, la adición de Mn produjo una leve disminución del Mn medido en disolución a pH 9,0. (**Figura VI-1**).

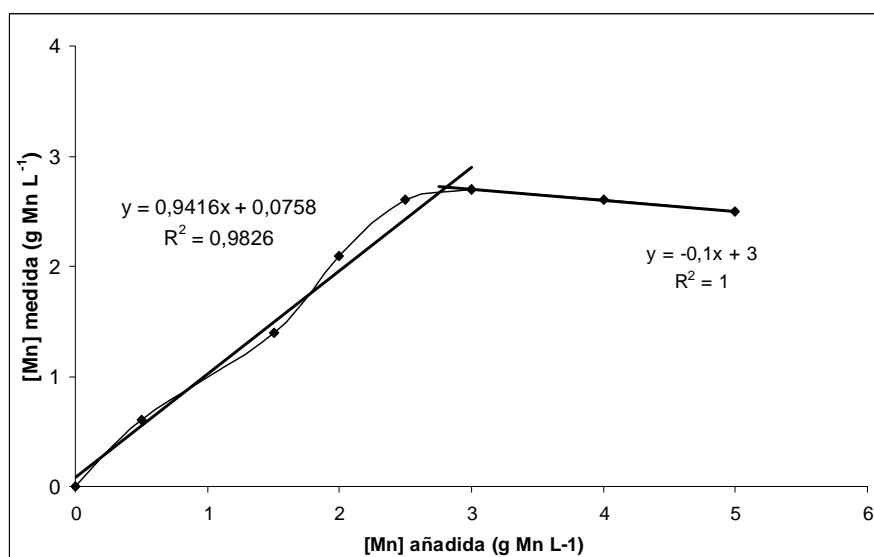


Figura VI-1. Capacidad de complejación de Mn en el NH₄-LS de eucalipto.

El segmento de subida se corresponde al proceso de complejación del Mn en el complejo LS y es similar al que se observó para el Zn (Apartado II). Por otra parte, el segmento de bajada, que en el caso del Zn, se relacionó con la coagulación del material por exceso de metal (Martín-Ortiz y col., 2009a), no presentó una disminución tan marcada en el caso del Mn. Más bien, presentó un segmento de

bajada con una pendiente suave, asemejándose a un proceso de saturación. Villén y col. (2007) encontraron curvas similares.

El punto medido en la intersección de las líneas, ajustadas mediante regresión lineal, indica la máxima capacidad de complejación del Mn en el LS (**Figura VI-1**). Este punto nos indica que la máxima capacidad de complejación de Mn para 20 g de LS L⁻¹ es de 2,7 g de Mn L⁻¹. Si tenemos en cuenta que la concentración de Mn añadida en ese punto es de 2,8 g de Mn L⁻¹, el porcentaje de Mn complejo respecto el añadido será del 97%. Esta máxima capacidad de complejación también puede expresarse como relación entre LS y Mn en peso. En este caso la relación LS/Mn (p/p) para la máxima capacidad de complejación tiene un valor cercano a 7.

Basándonos en estos datos, se preparó la disolución MnLS (5μM) que será utilizada en el ensayo hidropónico. Esta disolución presentó los siguientes valores de Mn total y complejo: Mn total 5,1 ± 0,4 μM y Mn complejo 4,6 ± 0,6 μM. Así pues, la concentración de Mn complejo en esta disolución será de aproximadamente un 90%.

4-2.- Evaluación del MnLS como fuente de Mn para trigo y maíz en cultivos hidropónicos a pH 8,5

Los resultados obtenidos muestran que las plantas de trigo que mayor peso seco presentaron (parte aérea y raíz) al finalizar el ensayo fueron las tratadas con MnLS, si bien no se apreciaron diferencias significativas con las tratadas con MnSO₄

(**Tabla VI-1**). Mascagni Jr y Cox (1985) observaron una respuesta similar en plantas de soja (*Glycine max*. L.) al aplicar MnLS y $MnSO_4$ en un suelo calcáreo. Estos autores apreciaron una respuesta similar en crecimiento vegetativo y concentración de elemento en parte aérea de las plantas cultivadas. Sadana y col. (2005) también observaron aumentos en el peso seco y longitud de la raíz de plantas de trigo al fertilizarlas con diferentes dosis de $MnSO_4$ en un cultivo hidropónico. Si bien al estos autores emplearon una disolución a pH 5,4 por lo que posiblemente, no se produjeron pérdidas de elemento por precipitación a su forma insoluble.

Tabla VI-1. Peso seco ($g \pm ET$), concentración de Mn ($\mu g \text{ g PS}^{-1} \pm ET$), Fe ($\mu g \text{ g PS}^{-1} \pm ET$) y relación Fe/Mn en parte aérea y raíz de plantas de trigo y maíz. ET= error típico para $n=4$. Diferentes letras en cada columna denota diferencias significativas entre tratamientos para $\alpha=0,05$. ns= no significativo.

<i>Tratamiento</i>	<i>Peso seco</i> (g)	<i>Mn</i> ($\mu g \text{ g PS}^{-1}$)	<i>Fe</i> ($\mu g \text{ g PS}^{-1}$)	<i>Fe/Mn</i>
TRIGO				
<i>Parte aérea</i>				
<i>0 Mn</i>	1,6 \pm 0,4 b	30 \pm 9 b	117 \pm 12 ns	3,9
<i>MnSO₄</i>	2,6 \pm 0,3 a	40 \pm 2 b	114 \pm 8	2,9
<i>MnLS</i>	3,0 \pm 0,5 a	61 \pm 5 a	104 \pm 8	1,7
<i>Raíz</i>				
<i>0 Mn</i>	0,7 \pm 0,1 b	23 \pm 2 b	170 \pm 13 ns	7,4
<i>MnSO₄</i>	0,9 \pm 0,1 a	24 \pm 4 ab	160 \pm 5	6,4
<i>MnLS</i>	1,1 \pm 0,2 a	29 \pm 2 a	160 \pm 8	5,5
MAIZ				
<i>Parte aérea</i>				
<i>0 Mn</i>	4,4 \pm 0,3 ns	58 \pm 2 b	61 \pm 9 ns	1,1
<i>MnSO₄</i>	5,1 \pm 0,3	66 \pm 3 a	52 \pm 3	0,8
<i>MnLS</i>	5,1 \pm 0,3	71 \pm 2 a	53 \pm 2	0,8
<i>Raíz</i>				
<i>0 Mn</i>	2,0 \pm 0,2 b	35 \pm 2 c	68 \pm 5 a	1,9
<i>MnSO₄</i>	3,0 \pm 0,1 a	46 \pm 2 b	60 \pm 3 ab	1,3
<i>MnLS</i>	3,3 \pm 0,2 a	52 \pm 2 a	55 \pm 3 b	1,1

La mayor concentración de Mn se midió en la parte aérea de las plantas fertilizadas con MnLS (**Tabla VI-1**). Teóricamente parte del Mn aplicado en forma de MnSO_4 a pH 8,5 debería haber pasado a formas insolubles poco disponibles para los cultivos debido a que es a partir de pH 7,5 cuando desciende la actividad de Mn^{2+} (Lindsay, 1979; Marschner, 1995; Burriel, 2003). Según este supuesto, la disponibilidad para el cultivo del Mn en disolución podría verse reducida al aplicarse en forma de MnSO_4 .

Marschner (1995) estableció en el intervalo de 10 a 20 mg Mn kg^{-1} el nivel crítico de Mn en plantas. En nuestro caso todas las plantas, incluso las que no recibieron ningún aporte de Mn, sobrepasan este nivel crítico. Este hecho podría tener su explicación en que los límites críticos de Mn en planta establecidos por Marschner (1995) varían en gran medida en función de la variedad de la planta a estudiar, su edad y las condiciones en las que se desarrolla. En nuestro caso las plantas de trigo muestreadas contaban con 21 días de desarrollo. En este sentido, Adriano (2001) recogió un valor cercano a 30 mg Mn kg^{-1} como nivel crítico de Mn en plantas de trigo cultivadas en disolución nutritiva, si bien este nivel crítico puede variar en función del dispositivo experimental empleado y en la edad de las plantas muestreadas. Que tanto las plantas fertilizadas con MnSO_4 y MnLS alcanzasen este teórico nivel crítico de nutrición de Mn puede estar relacionado con que no se encontrasen diferencias significativas en el crecimiento vegetativo de las mismas. Los datos de peso seco y de concentración de Mn en parte aérea parecen indicar que aunque existió una disminución en la capacidad del MnSO_4 , frente al MnLS, para suministrar Mn a la raíz de las plantas de trigo, esta reducción no impidió a las plantas fertilizadas con MnSO_4 alcanzar un nivel adecuado de este elemento en parte aérea.

Hierro (Fe) y Mn pueden presentar cierto antagonismo en planta (Marschner, 1995), por lo que en el estudio de la nutrición de Mn parece conveniente estudiar la relación entre ambos (Ghasemi-Fasei and Ronaghi, 2008). Adriano (2001) estableció un nivel de Fe/Mn en parte aérea de entre 1,5 y 2,5 para plantas sanas. En nuestro ensayo las únicas plantas de trigo donde se encontraron niveles de Fe/Mn dentro de los criterios de normalidad fueron las fertilizadas con MnLS, obteniéndose valores superiores al aplicar MnSO_4 o ninguna fuente de Mn (**Tabla VI-1**). Como la fuente de hierro en todos los tratamientos fue la misma (50 μM , FeEDDHA), cabe esperar que la variación en el índice Fe/Mn medido en la parte aérea de las plantas sea consecuencia de la disponibilidad del Mn en las distintas disoluciones nutritivas. Así pues, a la vista de las relaciones Fe/Mn obtenidas en la parte aérea de las plantas podríamos apuntar al MnLS como una fuente de Mn más adecuada que el MnSO_4 en las condiciones experimentales establecidas.

En plantas de maíz no se observaron diferencias significativas entre tratamientos cuando se comparó el peso seco de las plantas (**Tabla VI-1**). Esto parece indicar que los distintos tratamientos no afectaron el desarrollo vegetativo de dichas plantas. Respecto al Mn absorbido por el cultivo, aunque si se observaron diferencias significativas al comparar concentraciones de Mn en plantas tratadas con Mn (MnSO_4 y MnLS) frente a las control (0 Mn), estas últimas presentaron una alta concentración de Mn (58 $\mu\text{g g}^{-1}$). La alta concentración de elemento medida en plantas donde, supuestamente, no se había añadido ninguna fuente de Mn podría explicarse por una suma de factores como pueden ser la concentración natural de Mn en las semillas de maíz (18 mg Mn g^{-1} de semilla). A pesar de esto, los resultados obtenidos tanto en peso seco como en concentración de Mn en planta, apoyan la

propuesta de varios autores de que el maíz es poco sensible a la deficiencia de Mn (Reuter y col., 1988; Martens y Westermann, 1991; Marschner, 1995). Este hecho también se entrevé al observar los datos de la relación Fe/Mn (**Tabla VI-1**), que son más bajos que en plantas teóricamente más sensibles a la deficiencia de Mn como el trigo.

Para comparar la sensibilidad de varios genotipos de trigo a la deficiencia de Zn, Graham y col. (1992) utilizaron un índice consistente en el cociente de la cantidad de Zn extraída por cada una de las variedades de trigo ensayadas frente al elemento extraído por una variedad sensible a esta deficiencia. Como aproximación semi-cuantitativa de la eficiencia de los productos ensayados se puede utilizar una variación de este cociente. Para ello, se determinó el cociente entre la cantidad de Mn extraída por plantas tratadas con un determinado tratamiento (MnSO_4 y MnLS), entre la cantidad de Mn presente en plantas donde no se aplicó fuente alguna de Mn (0 Mn). Con la utilización de este índice se pretende minimizar el efecto del Mn introducido en el ensayo de manera “no controlada”, ya sea por el contenido natural de las semillas y por las eventuales impurezas presentes en los materiales y productos utilizados en el ensayo.

Tabla VI-2. Coeficiente de eficiencia de varios fertilizantes de Mn comparados con tratamiento sin Mn añadido para trigo y maíz, modificado de Graham y col. (1992).

Eficiencia como fuente de Mn	
<i>Trigo</i>	
<i>0 Mn</i>	1,0
<i>MnSO₄</i>	2,2
<i>MnLS</i>	3,8
<i>Maíz</i>	
<i>0 Mn</i>	1,0
<i>MnSO₄</i>	1,3
<i>MnLS</i>	1,4

Así, en trigo el tratamiento $MnSO_4$ fue unas dos veces más eficiente que el 0 Mn (sin Mn añadido) pero menos eficiente que la aplicación de MnLS a la disolución nutritiva (**Tabla VI-2**). En maíz tanto el $MnSO_4$ como el MnLS mostraron una eficiencia reducida como fuentes de Mn.

A la vista de los resultados obtenidos sería conveniente revisar y optimizar las condiciones experimentales empleadas en este ensayo. Así, como el aumento del tiempo de carencia de Mn a las plantas previo al trasplante, el incremento de la duración de los tratamientos, se conseguiría mitigar el efecto de la reserva de Mn presente en las semillas y eventualmente una mayor relevancia del efecto de las fuentes de Mn aplicadas.

4-3.- Mn total y disponible en productos NPK+MnLS y NPK+MnSO₄

Las concentraciones de Mn total y de Mn extraído por AB-DTPA en los productos recubiertos se muestran en la **Tabla VI-3**.

Tabla VI-3. Concentraciones de Mn total y asimilable (mg Mn kg⁻¹ NPK) así como coeficientes de variación (CV %) del Mn total en productos NPK preparados. Cada valor representa las medias de tres repeticiones \pm el error típico.

Producto	Mn total (mg kg ⁻¹)	Mn AB-DTPA (mg kg ⁻¹)	% Mn disponible/ Mn total	CV Mn total (%)
<i>NPK</i>	29 \pm 6	5 \pm 1	17	11
<i>NPK+MnSO₄ (0,1%)</i>	970 \pm 20	240 \pm 10	25	2
<i>NPK+MnLS (0,1%)</i>	950 \pm 20	600 \pm 30	63	2
<i>NPK+MnSO₄ (1,0%)</i>	9700 \pm 400	310 \pm 30	3	4
<i>NPK+MnLS (1,0%)</i>	9900 \pm 100	1500 \pm 100	15	2

La **Tabla VI-3** muestra que los coeficientes de variación del Mn total en los productos se mantuvieron entre el 2 y el 11%. Teniendo en cuenta tanto los bajos coeficientes de variación como las cantidades de Mn total de los productos (cercanas al Mn añadido), el procedimiento de adhesión del MnSO₄ y MnLS parece adecuado ya que los fertilizantes preparados presentan una concentración de Mn proporcional a la añadida y una homogeneidad suficiente.

Si se atiende al Mn disponible extraído en los fertilizantes los mayores porcentajes de elemento se obtuvieron en los NPK con MnLS adherido (**Tabla VI-3**). La disminución del porcentaje de Mn disponible/Mn total entre fertilizantes

NPK+Mn con 0,1% y fertilizantes NPK+Mn con 1,0% de elemento, ya estén adheridos con MnSO_4 o con MnLS, puede tener su explicación en el método de extracción. Aunque el método de extracción con AB-DTPA (Soltanpour y Workman, 1979) está ampliamente estudiado para determinar elemento disponible en suelos, su aplicación para determinar Mn disponible en un fertilizante con una cantidad elevada de elemento (1,0% Mn) puede resultar menos eficaz. Cabe recordar que, por un lado, la concentración de DTPA incluida en el extractante (0,005M) está optimizada para evaluar el contenido de elemento en suelo donde no es común encontrar cantidades de Mn disponible tan elevadas; y que por otro lado, la formación del complejo MnDTPA está menos favorecida que la formación de complejos con otros metales (por ejemplo, ZnDTPA o CuDTPA) (Lindsay, 1979).

En el producto NPK sin Mn añadido se observó la presencia de cierta cantidad de Mn procedente, posiblemente, de las materiales con los que se preparan estos fertilizantes complejos minerales.

4-4.- Evaluación del NPK+MnLS (0,1 y 1,0% Mn) como fuente de Mn para trigo cultivado en perlita

La **Tabla VI-4** muestra el peso seco, las concentraciones de Mn y Fe y la relación de estos dos elementos en la parte aérea de las plantas muestreadas al finalizar el ensayo.

Tabla VI-4. Peso seco (g \pm ET), concentración de Mn ($\mu\text{g g PS}^{-1} \pm$ ET), Fe ($\mu\text{g g PS}^{-1} \pm$ ET) y relación Fe/Mn en parte aérea y raíz de plantas de trigo y maíz. ET= error típico para n=4. Diferentes letras en cada columna denota diferencias significativas entre tratamientos para $\alpha=0,05$. ns= no significativo.

<i>Tratamiento</i>	<i>Peso seco (g)</i>	<i>Mn ($\mu\text{g g PS}^{-1}$)</i>	<i>Fe ($\mu\text{g g PS}^{-1}$)</i>	<i>Fe/Mn</i>
0,1 % Mn en NPK				
<i>NPK</i>	0,9 \pm 0,1 b	32 \pm 1 c	95 \pm 2 ns	3,0
<i>NPK+MnSO₄</i>	0,8 \pm 0,1 b	57 \pm 2 b	99 \pm 4	1,7
<i>NPK+MnLS</i>	1,1 \pm 0,5 a	72 \pm 4 a	110 \pm 8	1,5
1,0 % Mn en NPK				
<i>NPK</i>	0,6 \pm 0,2 b	25 \pm 3 b	112 \pm 16 ab	4,5
<i>NPK+MnSO₄</i>	0,8 \pm 0,1 a	132 \pm 24 a	87 \pm 13 b	0,7
<i>NPK+MnLS</i>	0,9 \pm 0,1 a	166 \pm 14 a	92 \pm 5 a	0,6

Las plantas de trigo que más peso seco y concentración de Mn presentaron en el material vegetal cosechado fueron las tratadas con NPK+MnLS. Si bien en el ensayo con dosis de Mn 1,0% no hubo diferencias significativas entre las plantas tratadas con NPK+MnLS y NPK+MnSO₄.

Aunque en mayor medida el producto adherido con MnLS, tanto la aplicación del NPK+MnLS como la aplicación del NPK+MnSO₄ produjo un aumento de concentración de Mn extraída por el cultivo respecto al tratamiento sin Mn añadido. El aumento de la absorción de Mn por plantas de trigo cultivadas en un suelo

calcáreo (pH 8,0) al aplicar NPK junto con MnSO_4 (40 kg ha^{-1} de MnSO_4) ya fue observado por Motamed (2006). Además del aumento de la concentración de Mn, este autor observó un incremento tanto en la cosecha de grano como en el porcentaje de proteínas en el mismo, al aplicar este producto frente a las parcelas experimentales donde se aplicó NPK sin suplemento de Mn. En nuestro ensayo, el aumento en la adición de Mn de 0,1% a 1,0% (equivalente a 1 kg ha^{-1} y 10 kg ha^{-1}) en los fertilizantes aplicados pudo influir en la semejanza de eficacias de los tratamientos NPK+MnLS y NPK+ MnSO_4 (1,0%). Randall y col. (1975) observaron que aplicaciones de 5 a 22 kg ha^{-1} (como MnSO_4) fueron las más eficaces para corregir la deficiencia de Mn en plantas de soja cultivadas en un suelo de pH 8,0. Por debajo de estos niveles, la aplicación de MnSO_4 fue insuficiente para la corrección de esta deficiencia nutricional. La aplicación del equivalente de 10 kg ha^{-1} en los NPK+Mn (1,0%) pudo suponer un exceso de fertilización de Mn, relativizando el efecto del medio en la eficacia de los fertilizantes. Este exceso de Mn se ve reflejado en las altas concentraciones de elemento medidas en la parte aérea de las plantas (Tabla VI-4).

Si se considera el índice Fe/Mn como referencia nutricional, sólo las plantas fertilizadas con NPK+MnLS y NPK+ MnSO_4 (0,1%) presentaron niveles dentro del límite de normalidad propuesto por Adriano (2001) (valores entre 1,5 y 2,5). Las plantas fertilizadas con NPK sin Mn añadido obtuvieron índices de Fe/Mn por encima del nivel de normalidad por lo que se las supone deficientes en Mn. Al contrario ocurre con las plantas fertilizadas con una dosis de 1,0% de Mn (ya sea MnLS o MnSO_4) a las que se las suponen niveles altos de manganeso (y/o deficientes en hierro) debido a que obtuvieron valores de Fe/Mn inferiores a este límite.

Respecto al Mn disponible extraído en la perlita tras el desarrollo del cultivo (**Figura VI-2**), se observa que el Mn aplicado en forma de NPK+MnLS quedó retenido en la parte superior de la perlita. Sin embargo, al aplicar NPK+MnSO₄, el Mn aplicado se distribuyó de forma más o menos uniforme en los 20 cm de sustrato.

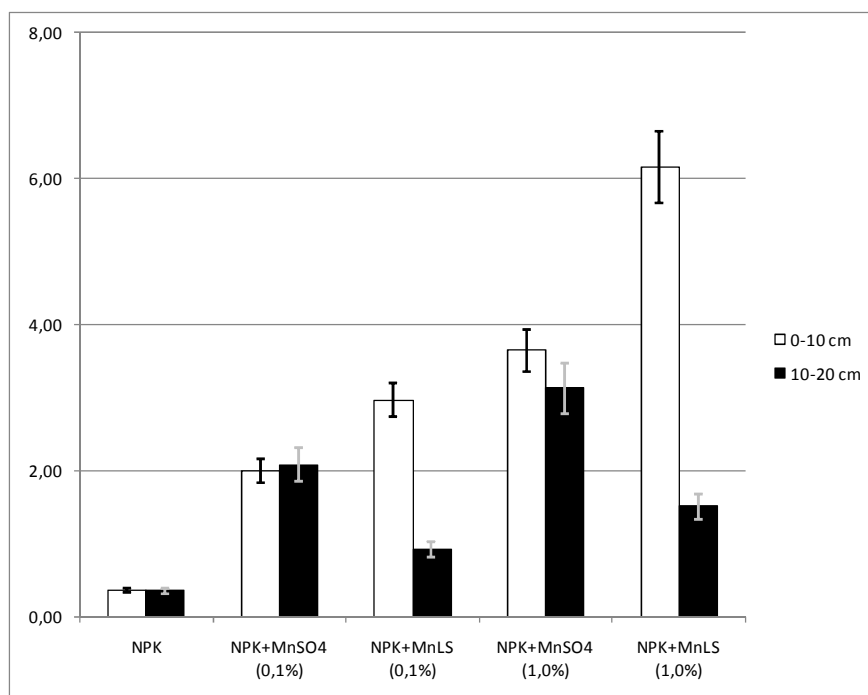


Figura VI-2. AB-DTPA Mn extraído de la perlita a dos profundidades de los dispositivos experimentales al finalizar el ensayo.

Esta retención de elemento, cuando es aplicado en forma de complejo con lignosulfonato ya fue observada para Zn (NPK+ZnLS) tanto en ensayos con columnas de lixiviación con perlita como en ensayos biológicos en perlita y suelo (Martín-Ortiz y col., 2009b). Álvarez y col. (1996), que también observaron retención de Zn al ser aplicado en forma de ZnLS en columnas de lixiviación con suelos calcáreos, asociaron esta baja movilidad con la fijación del ZnLS a ciertos componentes del suelo, como las arcillas. En este sentido, Hadimani y col. (1974)

estudiaron el movimiento del Mn aplicado como MnSO_4 junto con otras sustancias como disoluciones orgánicas procedentes de teca, eucalipto, bambú y ácido cítrico en columnas con suelo arenoso. Los autores observaron una retención del Mn en la capa superior de las columnas al ser aplicado en forma de complejo con ácido cítrico, asociando esta retención a una presunta unión complejo-mineral con algún componente del suelo. Utilizando un dispositivo experimental similar, Uren (1990) observó movimiento del Mn a zonas inferiores de las columnas al aplicar MnSO_4 y lavar las columnas con agua destilada. Estos datos son similares a los observados en nuestro experimento cuando se aplicó el producto NPK+ MnSO_4 (**Figura VI-2**).

Al igual que en el ensayo hidropónico la **Tabla VI-5** muestra los índices de eficiencia de los fertilizantes NPK+Mn empleados en el ensayo sobre perlita. La eficacia de los fertilizantes NPK+ MnSO_4 y NPK+MnLS como fertilizantes de Mn se evaluó en función de la cantidad de Mn extraída por las plantas que se trataron, relacionándola con la cantidad de Mn medida en plantas tratadas con NPK sin Mn añadido.

Tabla VI-5. Coeficiente de eficiencia de varios fertilizantes de Mn comparados con NPK sin Mn añadido, modificado de Graham y col. (1992).

Eficiencia como fuente de Mn	
<i>NPK</i>	1
<i>NPK+MnSO₄ (0,1%)</i>	1,6
<i>NPK+MnLS (0,1%)</i>	2,8
<i>NPK+MnSO₄ (1,0%)</i>	7,0
<i>NPK+MnLS (1,0%)</i>	10,0

Si se compara la eficiencia entre fuentes de Mn se observa una mayor eficacia en los NPK con MnLS adherido que en los NPK+MnSO₄. Como cabría esperar, para ambas fuentes, al aumentar la dosis de Mn la eficiencia como fuente de este elemento aumentó, aunque no proporcionalmente. En el ensayo donde se aplicó una cantidad de Mn de 0,1% la diferencia de eficacia entre los tratamientos NPK+MnLS y NPK+MnSO₄ fue de 1,8 a favor del producto recubierto con LS. Al aumentar la dosis de Mn en los fertilizantes al 1,0% esta diferencia se redujo a 1,4. También se observó una reducción de la efectividad de los tratamientos al pasar de cultivo hidropónico (MnLS y MnSO₄ en forma líquida, **Tabla VI-2**) al cultivo en perlita (NPK+MnLS y NPK+MnSO₄ en forma sólida, **Tabla VI-5**). Esta reducción en la eficacia de las fuentes de Mn pudo deberse a la interacción del MnLS y del MnSO₄ con los componentes del NPK y con la perlita (Mortvedt y Giordano, 1969).

5.- Conclusiones

El suministro de MnLS a plantas de trigo en un cultivo hidropónico puro a pH 8,5 aumentó el crecimiento y la concentración de Mn de la parte aérea de las plantas tratadas y otro donde se aplicó MnSO₄. Esto no fue así en plantas de maíz, posiblemente debido a la diferencia de sensibilidad a la deficiencia de Mn entre ambas especies.

El fertilizante NPK+MnLS ha mostrado ser una mejor fuente de Mn para plantas de trigo cultivadas en perlita que el NPK+MnSO₄. Este hecho fue más evidente al aplicar una dosis de Mn de 0,1% en los fertilizantes que al aplicar un 1,0% de elemento en los mismos.

A pesar de haber encontrado evidencias que indican que el NPK+MnLS es una fuente eficaz de Mn en trigo, para evaluar la eficiencia agronómica de estos productos de manera más precisa serían necesarios nuevos experimentos con un diseño experimental optimizado. Esto se podría hacer tomando como base los ensayos comentados en este trabajo y prestando especial atención a factores como: las propiedades químicas del Mn, obtención de plantas con un mayor grado de deficiencia del elemento, mayor duración de los tratamientos con Mn y una mejora del método de extracción de Mn disponible en los fertilizantes sólidos preparados.

VII.- DISCUSIÓN GENERAL

Si bien en los Capítulos del III al VI se han discutido los datos obtenidos en los ensayos correspondientes, en este Apartado VII se intentan resumir e integrar los resultados más relevantes de los distintos experimentos. Además, se discutirán ciertos aspectos que han recibido menos atención a lo largo de la presente memoria o que complementan algunos puntos tratados en la misma. Así se tratará de la capacidad complejante de Zn en el LS y de la eficacia del complejo ZnLS como fuente de Zn en disolución nutritiva y de la preparación de productos NPK con Zn adherido. Comentaremos el valor de la relación P/Zn en parte aérea como indicador nutricional del Zn, para finalmente tratar de cuantificar la eficiencia agronómica de los productos NPK con Zn adherido.

Estudio de la capacidad complejante de Zn del LS. Uno de los problemas que presenta la aplicación de LS como fertilizantes de micronutrientes reside en su complejidad estructural y en la dificultad para medir el metal complejado en los mismos (Villén y col., 2007).

Pang y col. (2008) sugirieron que la estructura molecular de un LS, especialmente su contenido de grupos hidrofílicos, ejerce una gran influencia en sus propiedades físico-químicas. En este sentido, varios autores han observado la importancia en la identificación de grupos funcionales, ya que podría existir relación entre la capacidad de complejación de metales y la presencia de ciertos grupos funcionales en LS (Stevenson, 1994; Hernández y col., 2006; Rodríguez-Lucena y col., 2009a).

En el Capítulo III de la memoria se relacionó la capacidad complejante de Zn en tres sales comerciales de LS ($\text{NH}_4\text{-LS}$ de abeto, Na-LS de abeto y Na-LS de eucalipto) con el porcentaje de grupos carboxílicos, fenólicos y sulfónicos presentes en su estructura. A la vista de los resultados obtenidos, se vinculó la mayor capacidad para complejar Zn del $\text{NH}_4\text{-LS}$ procedente de abeto, a una mejor relación de los porcentajes de grupos fenólicos y sulfónicos que la presentada por los productos Na-LS de abeto y eucalipto. El porcentaje de grupos carboxílicos no pareció influir en esta capacidad de complejación.

Si los grupos funcionales carboxílicos, fenólicos o sulfónicos, han influido en la capacidad para complejar Zn del LS, cabría esperar alguna variación estructural del LS al introducir el metal en el LS. Así, se realizaron los espectros de IR (FT-IR Bruker IFS60v, rango espectral $550\text{-}7000\text{ cm}^{-1}$ a 4 cm^{-1} de resolución) del $\text{NH}_4\text{-LS}$ de abeto en su estado inicial sin Zn añadido y tras incorporar Zn^{2+} en el LS hasta su máxima capacidad de complejación teórica (**Figura VII-1**). Se pretende observar la variación en las bandas más representativas de los grupos funcionales presentes en el LS que relacionamos con su capacidad de complejación del metal.

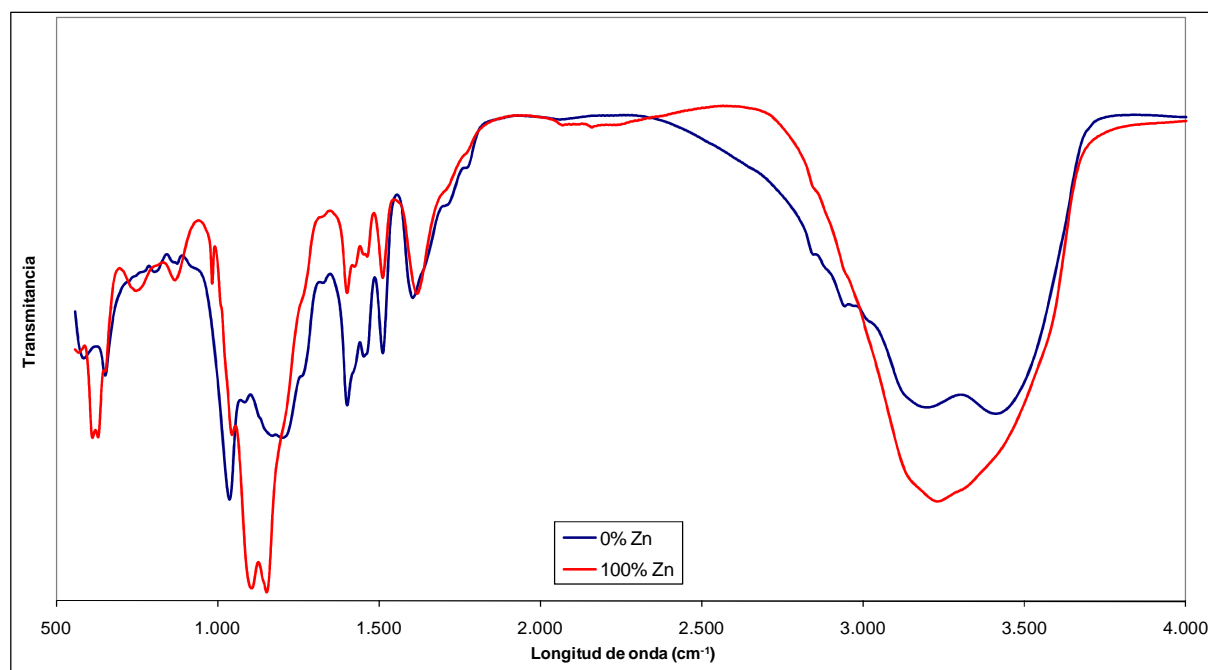


Figura VII-1. Espectros de IR de un $\text{NH}_4\text{-LS}$ procedente de abeto sin Zn añadido (línea azul) y del mismo producto en su máxima capacidad teórica de complejación con Zn (línea roja).

Según Fredheim y col. (2005), las vibraciones y estiramientos de los -OH presentes en los grupos sulfónicos aparecen a una longitud de onda cercana a 1000 cm^{-1} . En nuestro caso esta banda perdió intensidad en el espectro del LS donde se añadió Zn. Esta depresión en la intensidad de la banda pudo estar originada por la formación de enlace entre el -OH de los grupos sulfónicos y el Zn^{2+} . El descenso de intensidad en las bandas medidas entre 1470-1460 cm^{-1} (deformaciones del enlace C-H combinadas con vibraciones de anillo aromático), 1600-1500 cm^{-1} (vibraciones del enlace C=C) y a 1050 cm^{-1} (vibraciones de los enlaces C-O, C-C y C-OH presentes en polisacáridos) al incorporar el Zn en el LS podría relacionarse con la formación de fenolatos de Zn (Rodríguez-Lucena y col., 2009b). Por último, la no diferenciación de la banda medida entre 1630 y 1715 cm^{-1} (correspondiente a la vibración de grupos carboxilos y carbonilos no conjugados) (Rodríguez-Lucena y col., 2009b) en

los dos espectros parece indicar que la incorporación de Zn al LS no influyó en la distribución de estos grupos.

Para seguir avanzando en el estudio de los complejos LS de Zn o de otros metales como correctores de carencias de micronutrientes, sería conveniente mejorar la caracterización de estos productos. Como acabamos de comentar, el conocimiento de los grupos funcionales puede ser útil a la hora de caracterizar un producto MeLS (Me = Zn, Cu, Fe, Mn...), debido a su relación con la capacidad complejante del LS. En este sentido, habría que tener en cuenta el origen del LS y las condiciones en las que se realiza su extracción durante el proceso de obtención de la pasta de papel, ya que estos procesos influyen en el tipo y la cuantía de los grupos funcionales presentes en el LS así como en su tamaño molecular. Conforme se avance en el esclarecimiento de la estructura de los LS, más eficaz será el uso de los mismos en la agricultura.

Evaluación de la eficacia del ZnLS como fuente de Zn en disolución nutritiva. En el Apartado III se estudió el comportamiento del complejo ZnLS en estado líquido aplicado en hidroponía pura a distintos valores de pH. Así, los resultados obtenidos en el ensayo hidropónico a pH básico con trigo y maíz, muestran que las plantas tratadas con ZnLS presentaron un mayor incremento en materia seca y concentración de Zn en parte aérea que las tratadas con la sal ZnSO_4 .

Cakmak y col. (1997) describieron un índice para cuantificar la eficiencia de variedades de trigo para desarrollarse en suelos con deficiencia de Zn. Los autores fijaron este índice como la división del Zn extraído por cada variedad en un suelo

deficiente en Zn, entre el Zn absorbido por una variedad no eficiente en las mismas condiciones. En nuestro caso utilizaremos una modificación de dicho índice, que denominamos “Eficacia fertilizante de Zn”, y que será resultado de dividir el Zn medido en plantas donde se añadió alguna fuente de este elemento (los distintos tratamientos de Zn) entre el Zn presente en plantas cultivadas sin cinc añadido (**Tabla VII-1**). La ventaja de aplicar esta relación reside en que el índice muestra la eficiencia de los fertilizantes aplicados a la planta asumiendo que existe cierta cantidad de elemento que se incorpora al cultivo que tiene un origen distinto a los tratamientos, como es: el contenido natural de Zn de las semillas o eventuales impurezas no controladas.

Tabla VII-1. “Eficacia fertilizante de Zn” de los tratamientos aplicados a plantas de trigo y maíz en cultivo hidropónico puro. Zinc medido en la parte aérea de plantas tratadas con ZnSO_4 y ZnLS entre Zn obtenido en plantas tratadas sin Zn añadido.

<i>Tratamientos</i>	pH = 7,0	pH = 8,0	
	<i>Trigo</i>	<i>Trigo</i>	<i>Maíz</i>
<i>Sin Zn añadido</i>	1	1	1
<i>ZnSO₄</i>	4,4	2,0	2,2
<i>ZnLS</i>	4,3	5,7	8,6
<i>ZnEDTA</i>	5,3	-	-

En el ensayo con trigo donde la disolución nutritiva se mantuvo a pH = 7,0, se observó una mayor eficacia del ZnEDTA como fuente de Zn, seguida por los productos ZnLS y ZnSO_4 , los cuales presentaron una efectividad similar. A pH = 7,0 el quelato sintético ZnEDTA mantiene más elemento en disolución que el ZnLS y ZnSO_4 (Lindsay, 1979). El pH neutro también puede relacionarse con el hecho que

ZnLS y ZnSO_4 presenten eficiencias similares ya que, al encontrarnos a pH 7,0, la formación de compuestos insolubles de Zn^{2+} no está favorecida (Alloway, 1995; Burriel y col., 2003). Según estos autores la formación de los compuestos insolubles de Zn se acentúa a partir de pH 7,5, aproximadamente. Esto parece confirmarse al comparar la eficiencia de los fertilizantes en el ensayo de trigo a pH = 7,0 con la obtenida a pH = 8,0 (**Tabla VII-1**). Al aumentar el pH de la disolución hasta 8,0, la eficiencia del ZnSO_4 disminuye, posiblemente debido a la formación de óxidos e hidróxidos de Zn. En este ensayo la efectividad del ZnLS aumentó respecto al ensayo a pH = 7,0. Al incrementar el pH en el medio de 7,0 a 8,0, el complejo ZnLS mantuvo buena parte del Zn aplicado en disolución y las diferencias con los otros tratamientos, ZnSO_4 y sin Zn añadido fue mayor.

Por otro lado, si se comparan los resultados obtenidos en trigo y maíz a pH 8,0 (**Tabla VII-1**), se observan índices mayores para el maíz que para el trigo. Esto podría estar relacionado con la mayor sensibilidad a la deficiencia de Zn atribuida al maíz en comparación con el trigo (Martens y Westermann, 1991). En general, los tratamientos donde se aplica alguna fuente de Zn producirán un mayor efecto en especies sensibles a la deficiencia de Zn, como el maíz, que en cultivos menos sensibles a esta deficiencia nutricional, como el trigo.

Preparación de productos NPK con Zn adherido. Una vez comprobado que el ZnLS era capaz de suministrar Zn vía radicular a la planta, se preparó el producto NPK con ZnLS adherido. La incorporación de micronutrientes en fertilizantes complejos minerales (NPK) es un procedimiento empleado en la fabricación de fertilizantes destinados a explotaciones cerealistas (Jackson y col., 1962). Esta unión de macro- y

micronutrientes, permite una optimización en la nutrición de dichos cultivos disminuyendo, además, costes en carburante y mano de obra (Cakmak, 2008).

Uno de los principales problemas que presenta la adición de Zn a fertilizantes NPK es que la eventual interacción entre los componentes del complejo mineral y la fuente de Zn pueden reducir la disponibilidad del mismo para el cultivo. Además, el método empleado para preparar los productos NPK+ZnLS y NPK+ZnSO₄ debe de proporcionar no sólo productos efectivos como fuentes de Zn, sino también fertilizantes de Zn homogéneos, con la misma cantidad de Zn por gramo en cada partida preparada. De otro modo, un producto heterogéneo podría concentrar la aplicación del micronutriente en una zona específica del cultivo, disminuyendo la distribución del fertilizante y con ello su efectividad agronómica.

La integración del ZnLS a un fertilizante NPK se puede realizar por adhesión del ZnLS al producto NPK o mediante la incorporación del mismo a las materias primas constituyentes del NPK en su proceso de fabricación. Los métodos de adhesión o de recubrimiento de productos fertilizantes presentan ventajas como la liberación lenta de los componentes de los productos al suelo, según indican diversos autores (Rico y col., 1995 y 1996; Tomaszewska y Jarosiewicz, 2006; Wu y col., 2008). Por otro lado, incorporar el producto ZnLS en la fase de mezcla de las materias primas constituyentes del abono NPK facilitaría su producción industrial. Este método presenta el inconveniente de que una elevada interacción entre dichas materia primas y el ZnLS podría disminuir su capacidad para mantener el Zn en disolución y por lo tanto su disponibilidad para los cultivos. El método de

integración del Zn al NPK empleado en nuestros ensayos fue el de adherencia. Además, se decidió no incluir un recubrimiento con resina a la hora de preparar los productos NPK+ZnLS por dos razones: la primera es que el LS ya presenta capacidad de adhesión (Suzuki y col., 1989); la segunda es que Álvarez y col. (1996) mostraron que la aplicación de un recubrimiento de resina en una urea recubierta con ZnLS no mejoró su eficiencia como fertilizante de Zn.

Como se ha ido comentando en los diferentes Apartados, la homogeneidad de los productos NPK+ZnLS preparados y aplicados en los ensayos biológicos se determinó mediante el cálculo del coeficiente de variación (CV) de Zn total medido en dichos fertilizantes (**Tabla VII-2**).

Tabla VII-2. Coeficiente de variación (CV) de Zn (Mn) total de los productos aplicados en los ensayos biológicos. Escala de preparación: Laboratorio 500 veces inferior a Semi-Industrial. N = número de muestras recogidas para realizar el CV.

<i>NPK+ZnLS aplicado a ensayo:</i>	<i>CV (%)</i>	<i>N</i>	<i>Escala de preparación</i>
<i>Trigo – Perlita y Suelo</i>	5	8	Semi-Industrial
<i>Trigo - Campo</i>	5	8	Semi-Industrial
<i>Maíz – Perlita y Suelo</i>	4	8	Laboratorio
<i>Maíz - Campo</i>	9	8	Semi-Industrial
<i>Trigo – Perlita (Mn)</i>	2	3	Laboratorio

La **Tabla VII-2** muestra los CV de Zn obtenidos en todas las tandas de NPK+ZnLS (0,1 y 0,2%) preparadas, así como el CV de Mn en los NPK+MnLS (0,1 y 1,0%) formulados en el Capítulo VI. La homogeneidad de los productos preparados en una escala menor (laboratorio) fue ligeramente superior que la presentada por

los fertilizantes adheridos en una escala semi-industrial. Aun así, todos los NPK con LS adherido presentaron una homogeneidad tolerable (entre el 2 y el 9% de variabilidad).

Así pues, el método empleado en el presente trabajo para incorporar el ZnLS (y el MnLS) a los productos NPK presentó niveles de reproducibilidad aceptables ($CV \leq 10\%$).

Relación P/Zn en parte aérea como indicador nutricional del Zn. Los valores de la relación P/Zn obtenidos en nuestros experimentos (**Tabla VII-3**), y discutidos en los Apartados III, IV y V, han variado en función de la especie y de los dispositivos experimentales empleados. Así, los resultados obtenidos en los ensayos hidropónicos muestran que el mayor incremento de peso seco se obtuvo en plantas con una relación P/Zn de 5 para trigo y 13 para maíz. Cuando el sustrato empleado fue perlita expandida los niveles de P/Zn donde se observó mayor incremento de peso seco fueron cercanos a 25 para trigo y 100 para maíz. Por otro lado, en los ensayos con suelo en condiciones controladas, dichos niveles fueron 36 para trigo y 25 para maíz.

En cuanto a los experimentos en campo, para trigo no se observaron diferencias significativas en el peso de grano cosechado, y los valores de P/Zn medidos en plantas de los distintos tratamientos variaron entre 80 y 100. Por otro lado, para maíz las relaciones P/Zn encontradas en los ensayos de campo se redujeron notablemente en comparación con los niveles medidos en condiciones controladas.

Tabla VII-3. Relación P/Zn medida e incrementos de peso seco (cosecha de grano en ensayos de campo) en la parte aérea de las plantas de los diferentes ensayos. El dato ΔPS (%) es el porcentaje de peso seco de parte aérea obtenido en cada tratamiento dividido entre el peso seco obtenido en las plantas donde no se añadió Zn.

Trigo			Maíz		Breve descripción ensayo
Ensayo/Tratamientos	P/Zn	ΔPS (%)	P/Zn	ΔPS (%)	
<u>Hidropónico I</u>					
<i>Sin Zn añadido</i>	64	.	-	-	Ensayo hidropónico puro. pH de la disolución nutritiva = 7,0. Zn aplicado (3,0 μ M) Ensayo en invernadero. Plantas cosechadas con 21 días de desarrollo.
<i>ZnSO₄</i>	13	0	-	-	
<i>ZnLS</i>	6	0	-	-	
<i>ZnEDTA</i>	3	0	-	-	
<u>Hidropónico II</u>					
<i>Sin Zn añadido</i>	27	.	350	.	Ensayo hidropónico puro. pH de la disolución nutritiva = 8,0. Zn aplicado (3,0 μ M) Adición 0,1 g L ⁻¹ CaCO ₃ (s). Ensayos en cámara de cultivo. Plantas cosechadas con 21 días de desarrollo.
<i>ZnSO₄</i>	12	0	80	0	
<i>ZnLS</i>	5	77	13	33	
<u>Perlita I</u>					
<i>NPK</i>	100	.	1300	.	Ensayo en perlita. NPK = 8:15:15 (maíz); 8:24:8 (trigo) 14 g NPK-Zn(0,1% trigo; 0,2% maíz) Adición 0,1 g L ⁻¹ CaCO ₃ (s). Ensayos en cámara de cultivo. Plantas cosechadas con 28 días de desarrollo.
<i>NPK+ZnSO₄</i>	100	0	215	100	
<i>NPK+ZnLS</i>	25	13	100	125	
<u>Suelo</u>					
<i>NPK</i>	100	.	190	.	Ensayo en suelo. NPK = 8:15:15 (maíz); 8:24:8 (trigo) 2 g NPK-Zn (0,1% trigo; 0,2% maíz) Adición 0,1 g L ⁻¹ CaCO ₃ (s). Ensayos en cámara de cultivo. Plantas cosechadas con 28 días de desarrollo.
<i>NPK+ZnSO₄</i>	88	7	85	0	
<i>NPK+ZnLS</i>	36	36	25	40	
<u>Campo I</u>					
<i>NPK</i>	100	.	-	-	Ensayo en campo. NPK = 8:24:8 (0,1% Zn) Localización: Villamarciel, Valladolid. Suelo:Zn disponible (AB-DTPA)=0,2 Suelo: P Olsen = 32 mg kg ⁻¹ Plantas cosechadas fin ciclo biológico.
<i>NPK+ZnSO₄</i>	93	0	-	-	
<i>NPK+ZnLS</i>	83	0	-	-	
<u>Campo II</u>					
<i>NPK</i>	-	-	9	.	Ensayo en campo. NPK = 8:15:15 (0,2% Zn) Localización: Quinto del Ebro, Zaragoza. Suelo:Zn disponible (AB-DTPA)=0,9 Suelo: P Olsen = 14 mg kg ⁻¹ Plantas cosechadas fin ciclo biológico.
<i>NPK+ZnSO₄</i>	-	-	4	0	
<i>NPK+ZnLS</i>	-	-	2	6	
<u>Campo III</u>					
<i>NPK</i>	-	-	24	.	Ensayo en campo. NPK = 8:15:15 (0,2% Zn) Localización: Barrax, Albacete. Suelo:Zn disponible (AB-DTPA)=0,4 Suelo: P Olsen = 25 mg kg ⁻¹ Plantas cosechadas fin ciclo biológico.
<i>NPK+ZnSO₄</i>	-	-	11	6	
<i>NPK+ZnLS</i>	-	-	7	14	

Así, en la parcela experimental los niveles de P/Zn en planta variaron entre 2 y 9, y la concentración de Zn disponible fue de 0,9 mg kg⁻¹ (Campo II en **Tabla VII-3**). En la parcela con 0,4 mg kg⁻¹ (Campo III en **Tabla VII-3**) de Zn disponible, los valores de la relación P/Zn fueron de 7–24. Conviene recordar que sólo se obtuvieron diferencias significativas en cosecha de grano en la parcela con el índice de Zn disponible más bajo (Campo III).

En general, es un hecho aceptado que la aplicación excesiva de abonado de P reduce la absorción de Zn por los cultivos, si bien, varios autores señalan la posibilidad de una variación en el contenido de P en planta en función del Zn suministrado. Tanto Huang y col. (2000) como Imtiaz y col. (2006) coinciden en que la aplicación de Zn puede influir en la absorción de P de una especie vegetal en función de su sensibilidad a la deficiencia de Zn en el medio. Así, estos autores observaron que en cultivares de trigo sensibles a la deficiencia de Zn, la concentración de P medida en parte aérea disminuyó en función del incremento en la fertilización con Zn.

En nuestros ensayos, tanto la medida de peso seco como la concentración de Zn en parte aérea de las plantas han permitido observar diferencias en la eficiencia como fuentes de Zn de los fertilizantes evaluados. Esto no fue así en el ensayo hidropónico con trigo a pH 7,0 (Apartado III), ni en el ensayo de campo con trigo (Apartado V), donde no se observaron diferencias significativas ni en peso seco (cosecha de grano en campo) ni en concentración de Zn en la parte aérea de las plantas muestreadas. Para estos experimentos los índices P/Zn si se diferenciaron entre tratamientos (**Tabla VII-3**). En ambos casos, la menor relación P/Zn se obtuvo

en plantas fertilizadas con ZnLS, ya sea en disolución o adherido en el NPK, seguida por la relación obtenida en plantas donde se aplicó ZnSO_4 . Esta variación del P/Zn puede indicar una diferencia en la disponibilidad del Zn aportado por los diferentes tratamientos, aunque dicha variación no fuese suficiente para producir un aumento significativo en el crecimiento del cultivo. En este sentido varios autores como Takkar y col. (1976) y Maftoun y Karimian (1989) observaron una mejor relación entre el índice P/Zn y la nutrición del P y del Zn en planta, que las medidas de concentración de Zn y P por separado.

El hecho experimental repetido que hemos observado en todos nuestros ensayos biológicos, fue que siempre que se añadió Zn al medio de cultivo se observó un descenso de la concentración de P en la parte aérea de las plantas tratadas. La consideración de que P y Zn presenten un antagonismo en planta (Loneragan y col., 1982; Cakmak y Marschner, 1986; Marschner, 1995) y de que la adición de P al medio de cultivo fue constante en todos los tratamientos aplicados en cada uno de los ensayos, permite indicar que la relación P/Zn es un buen indicador nutricional de Zn en las plantas tratadas. Podemos concluir que existe un efecto antagónico del Zn sobre el P en planta.

Los valores de la relación P/Zn varían en función de la especie y de los dispositivos experimentales empleados, por lo que no es posible establecer unos valores de referencia universales. Una vez fijados la especie vegetal y las condiciones de cultivo, como pH y contenidos de P y Zn en el suelo, la relación P/Zn en parte aérea de la planta sería un buen indicador de la nutrición de Zn.

Evaluación de la eficiencia agronómica de productos NPK con Zn adherido. La eficiencia agronómica de un fertilizante de micronutrientes se determina, generalmente, evaluando el efecto de su aplicación (aumento de peso seco de parte aérea o de grano, concentración de elemento en parte aérea, etc...) a un determinado cultivo.

La medida de Zn total en un fertilizante, no es un buen indicador de su eficiencia como fuente de Zn para los cultivos (Slaton y col., 2005), aunque proporciona información sobre la homogeneidad de los productos preparados. Según varios autores el nivel de Zn soluble de un fertilizante sólido es el índice más adecuado para prever su eficiencia como fuente de Zn para los cultivos (Mortvedt y Giordano, 1969; Mortvedt, 1992; Amrani y col., 1999; Gangloff y col., 2002; Slaton y col., 2005). Sin embargo, al incorporar el Zn en un NPK la solubilidad del micronutriente puede disminuir debido a interacciones fisicoquímicas entre ambos (Mortvedt y Gilkes, 1993).

En los fertilizantes NPK+ZnLS y NPK+ZnSO₄ preparados a lo largo de este trabajo se midió el Zn extraído por AB-DTPA, que es un método propuesto por Soltanpour y Workman (1979) para determinar concentraciones de micronutrientes disponibles en suelo. Esta fracción de elemento, denominada “disponible” para la planta parece estar bien relacionada con la capacidad de las diferentes fuentes de Zn para suministrar el oligoelemento al cultivo. La **Tabla VII-4** muestra la correlación entre el Zn extraído por AB-DTPA en los fertilizantes NPK+Zn (ZnLS y ZnSO₄) y su eficiencia agronómica en los diferentes ensayos. Se entiende por eficiencia agronómica la respuesta del cultivo a la adición de estos

fertilizantes, respecto a parámetros como: peso seco (g), cosecha de grano (kg ha⁻¹, en ensayos de campo), concentración de Zn (mg kg⁻¹) y relación P/Zn en parte aérea de las plantas tratadas en los diferentes dispositivos experimentales. Para calcular los coeficientes de correlación de Pearson mostrados en la **Tabla VII-4**, se estimó la relación lineal entre dos variables cuantitativas: el Zn disponible extraído por AB-DTPA en los fertilizantes NPK+Zn aplicados al cultivo y su eficiencia agronómica en los diferentes diseños experimentales para trigo y maíz. Se seleccionó este índice estadístico debido a que es independiente de la escala de medida de las variables. El cálculo estadístico se realizó con el programa SPSS 15.0.

Tabla VII-4. Coeficientes de correlación de Pearson entre el Zn extraído por AB-DTPA y el efecto de la aplicación en trigo y maíz de los productos NPK+ZnLS y NPK+ZnSO₄ en diferentes diseños experimentales (n=12).

	<i>Coeficientes de correlación de Pearson</i>								
	<i>Perlita</i>			<i>Suelo (cond. controladas)</i>			<i>Campo</i>		
	<i>PS</i>	<i>[Zn]</i>	<i>P/Zn</i>	<i>PS(g)</i>	<i>[Zn]</i>	<i>P/Zn</i>	<i>Cosecha</i>	<i>[Zn]</i>	<i>P/Zn</i>
AB-DTPA Zn en los productos aplicados a									
<i>Trigo</i>	0,57	0,91***	-0,99***	0,88**	0,93***	-0,94***	0,16	0,42	-0,37
<i>Maíz</i>	0,78**	0,94***	-0,61*	0,82**	0,98***	-0,88**	0,77**	0,70**	-0,62*

* La correlación es significativa al nivel 0,05.

** La correlación es significativa al nivel 0,01.

*** La correlación es significativa al nivel 0,001.

En general, los datos de concentración de Zn extraído con AB-DTPA en los fertilizantes NPK+Zn se correlacionan de manera significativa con la respuesta de los cultivos a la aplicación de los mismos. Esto es así para ambos cultivos, en los tres diseños experimentales donde se aplicaron los productos NPK+Zn, exceptuando en el ensayo con trigo en campo, donde no se observó ninguna correlación significativa. La significación de las correlaciones disminuye en los ensayos de

campo, posiblemente debido a que aumenta el número de variables “no controladas” en comparación con los ensayos realizados en cámara de cultivo. Las correlaciones entre el Zn disponible extraído en los fertilizantes y el Zn medido en la parte aérea de las plantas son altas en ambos cultivos, mientras que en el resto de parámetros las correlaciones varían, en menor o mayor medida, entre ambas especies.

Según los datos obtenidos la determinación de AB-DTPA Zn de los fertilizantes ofrece información sobre su eficiencia agronómica, sobre el Zn que va a quedar disponible para el cultivo, si bien se tienen que tener en cuenta tanto el tipo de cultivo como las condiciones experimentales donde van a ser aplicados dichos fertilizantes.

Como se indica en el párrafo anterior, el peso seco y la concentración de Zn determinadas en la parte aérea de las plantas cosechadas son parámetros utilizados para evaluar la eficiencia de los productos como fertilizantes de Zn. En los ensayos presentados en este trabajo el producto que, en general, ha proporcionado más Zn a las plantas ha sido el NPK+ZnLS, en comparación con el NPK+ZnSO₄. Como aproximación cuantitativa de la eficiencia de los productos ensayados, se puede utilizar una variación del coeficiente empleado por Graham y col. (1992). Estos autores compararon la eficiencia de varios cultivares de trigo para absorber Zn del medio empleando la el siguiente coeficiente:

$$\text{Eficiencia} = \text{Cosecha}_{(\text{kg ha}^{-1})} \cdot [\text{Zn}]_{(\text{mg kg}^{-1})}$$

En nuestro caso para evaluar, no ya la eficiencia de la variedad sino la eficiencia de un fertilizante aplicado a un cultivo, utilizaremos una variación de este índice:

$$\text{Eficiencia (fertilizante x)} = \frac{PS_x \text{ (g)} \cdot [Zn]_x \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)}}{PS_0 \text{ (g)} \cdot [Zn]_0 \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)}}$$

El índice de eficiencia de un determinado fertilizante de Zn (x) se determinará comparando la cantidad de Zn extraído en plantas tratadas con dicho fertilizante (peso seco por concentración del elemento), y el elemento determinado en plantas sometidas a las mismas condiciones experimentales y a las que no se ha añadido Zn (0). El Zn obtenido en la parte aérea de plantas tratadas sin Zn añadido, debe provenir del contenido natural de las semillas, del NPK, del suelo y, eventualmente, de las impurezas de Zn presentes en los reactivos utilizados en los ensayos.

Según los datos que se muestran en la **Tabla VII-5**, el producto NPK+ZnLS presentó una eficacia 2 veces superior como fuente de Zn para el trigo que el NPK+ZnSO₄. En el caso del maíz, la eficiencia de los fertilizantes aplicados varía en función del sustrato donde se desarrolló el cultivo. En perlita, el NPK+ZnSO₄ fue 11 veces más eficaz como fertilizante del micronutriente que el tratamiento sin Zn añadido, y sin embargo el NPK+ZnLS presentó una eficiencia 22 veces superior a éste.

Tabla VII-5. Coeficiente de eficiencia de varios fertilizantes de Zn comparados con NPK sin Zn añadido (modificado de Graham y col. (1992)).

	<i>Trigo</i>	<i>Maíz</i>
<u>Perlita</u>		
<i>NPK</i>	1	1
<i>NPK+ZnSO₄</i>	1	11
<i>NPK+ZnLS</i>	2	22
<u>Suelo (condiciones controladas)</u>		
<i>NPK</i>	1	1
<i>NPK+ZnSO₄</i>	1	2
<i>NPK+ZnLS</i>	2	5

En suelo, el NPK con ZnSO₄ adherido fue 2 veces más eficiente que el tratamiento control, mientras que el NPK adherido con ZnLS aumentó la eficiencia del control en 5 veces. Como se ha comentado a lo largo de este trabajo, la diferencia entre las propiedades físico-químicas de los sustratos empleados y las distintas sensibilidades a la deficiencia de Zn entre el trigo y el maíz, pudo influir en la diferencias de eficiencia presentada por los productos.

En resumen y a la vista de los resultados obtenidos, la aplicación del producto NPK+ZnLS es más eficaz que el NPK+ZnSO₄, cuando se aplica en maíz cultivado en suelos calcáreos y con pH alcalino (cerca de 8,0). Además, su efecto positivo en la producción de grano y en su contenido de Zn, será mayor cuanto más deficiente en Zn sea el suelo y más intensiva sea la explotación agrícola donde se aplique el fertilizante.

VIII.- CONCLUSIONES

En base a todo lo expuesto anteriormente, las conclusiones más relevantes obtenidas en este trabajo podrían resumirse en los siguientes puntos:

1. Se preparó un complejo ZnLS partiendo de una sal de LS amónica procedente de abeto, en función de su mayor capacidad para complejar Zn frente a dos sales LS sódicas de abeto y eucalipto. La relación estequiométrica donde la capacidad del $\text{NH}_4\text{-LS}$ para complejar Zn fue máxima, es un valor cercano a 1,7 LS:Zn (p:p). Este ZnLS mostró evidencias de ser una fuente de Zn cuatro veces más eficaz para plantas de trigo y maíz que el ZnSO_4 en cultivos hidropónicos a pH 8,0.

2. Mediante un proceso de adhesión, el producto ZnLS se incorporó a un complejo mineral NPK, obteniendo fertilizantes (NPK+ZnLS) con concentraciones de Zn homogéneas (coeficientes de variación $\leq 10\%$).

3. Para trigo y maíz cultivados en condiciones controladas, sobre perlita y suelo, la aplicación de NPK con ZnLS adherido incrementó el crecimiento y la concentración de Zn de la parte aérea de las plantas frente a la adición de NPK con ZnSO_4 adherido. En estos dispositivos experimentales, la eficacia del NPK+ZnLS fue el doble, que la obtenida al aplicar NPK+ ZnSO_4 frente a un producto sin Zn añadido. En general, el efecto de ambos fertilizantes fue mayor para maíz que para trigo.

4. En condiciones de campo (suelo calcáreo) se observó que la aplicación de NPK+ZnLS (0,2% Zn) incrementó la cosecha de grano y la concentración de Zn en parte aérea de plantas de maíz tras la aplicación de NPK+ZnSO₄ (0,2% Zn). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al 90% en cosecha de grano ni en concentración de Zn de la parte aérea de las plantas de trigo tratadas con NPK+Zn (0,1%).

5. Empleando la metodología aplicada para la preparación de NPK+ZnLS se formularon dos fertilizantes NPK+MnLS con 0,1 y 1,0% de Mn. La adición de NPK+MnLS (0,1%) fue el tratamiento más eficiente en la nutrición de plantas de trigo cultivadas en perlita en comparación con la de NPK+MnSO₄. En general, los resultados obtenidos con MnLS no fueron tan concluyentes que los obtenidos con ZnLS. Parece necesaria una optimización de la metodología experimental para evaluar de manera más eficaz los fertilizantes NPK+MnLS preparados.

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo han mostrado que los productos NPK+ZnLS son fuentes de Zn adecuadas para su aplicación a cultivos de trigo y maíz cultivados bajo condiciones alcalinas y/o calcáreas. El producto mostró mayor eficacia al ser aplicado en suelos con niveles deficientes de Zn y en explotaciones de cultivos sensibles a esta deficiencia, donde se desarrolla una agricultura extensiva de regadío en las que se obtienen producciones de grano elevadas.

IX.- BIBLIOGRAFÍA

Abbasi, P.A., Soltani, N., Cuppels, D.A., and Lazarovits, G. (2002): Reduction of Bacterial Spot Disease Severity on Tomato and Pepper Plants with Foliar Applications of Ammonium Lignosulfonate and Potassium Phosphate. *Plant Disease*, 86, 1232-1236.

Adiloglu, S. (2006): The Effect of Increasing Nitrogen and Zinc Doses on the Iron, Copper and Manganese Contents of Maize Plants in Calcareous and Zinc Deficient Soils. *Asian Journal of Plant Science*, 5, 504–507.

Adriano, D.C. (2001): Manganese. In *Trace Elements in Terrestrial Environments Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals*. Springer. New York, Berlin and Heidelberg. pp 547-585.

Adriano, D. C., Paulsen, G. M., and Murphy, L. S. (1971): Phosphorus-Iron and Phosphorus-Zinc Relationships in Maize (*Zea mays* L.) Seedlings as Affected by Mineral Nutrition. *Agronomy Journal*, 63, 36–39.

Ajourri, A., Asgedom, H., and Becker, M. (2004): Seed Priming Enhances Germination and Seedling Growth of Barley under Conditions of P and Zn Deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 167, 630–636.

Alam, S. M., and Shereen, A. (2002): Effect of Different Levels of Zn and Phosphorus on Growth and Chlorophyll Concentration of Wheat. *Asian Journal of Plant Science*, 4, 364–366.

Albers, C.N., Banta, G.T., Jacobsen, O.S., and Hansen, P.E. (2008): Characterization and Structural Modelling of Humic Substances in Field Soil Displaying Significant Differences From Previously Proposed Structures. *European Journal of Soil Science*, 59, 693-705.

Alkanani, T., and MacKenzie, A.F. (1996): Banding Urea and Lignosulfonate in Corn (*Zea mays* L.) Production and ¹⁵N Recovery. *Canadian Journal of Soil Science*, 76, 365-371.

Alloway, B. J. *Heavy Metals in Soils*. Blackie Academic Professional: London, U.K. 1995.

Alloway, B.J. (2008a): Micronutrients and Crop Production: An Introduction. In *Micronutrients Deficiencies in Global Production*. B.J. Alloway Editor. Springer Science + Business Media B.V., 1 pp.

Alloway, B.J. (2008b): Enrichment of Cereal Grains with Zinc: Agronomic or Genetic Biofortification?. *Plant and Soil*, 302, 1-17.

Alloway, B.J. (2004): Zinc in Soils and Crop Nutrition. International Zinc Association. Brussels. (<http://www.zincworld.org/Documents/Communications/Publications>)

Alonso, M. V., Olier, M., Rodriguez, F., Garcia, J., Gilarranz, M. A., and Rodriguez, J. J. (2005): Modification of Ammonium Lignosulfonate by Phenolation for Use in Phenolic Resins. *Bioresource Technology*, 96, 1013–1018.

Alvarez, J.M., Almendros, P., and Gonzalez, D. (2009): Residual Effects of Natural Zn Chelates on Navy Bean Response, Zn Leaching and Soil Zn Status. *Plant and Soil*, 317, 277-291.

Alvarez, J. M., and Gonzalez, D. (2006): Zn Transformations in Neutral Soil and Zn Efficiency in Maize Fertilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9488–9495.

Alvarez, J.M., Novillo, J., Obrador, A., and López-Valdivia, L.M. (2001): Mobility and Leachability of Zinc in Two Soils Treated with Six Organic Zinc Complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3833-3840.

Alvarez, J.M., Rico, M.I., and Obrador, A. (1996): Lixiviation and Extraction of Zn in a Calcareous Soil Treated with Zn-Chelated Fertilizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3383-3387.

Alvarez, J.M., and Rico, M.I. (2003): Effects of Zinc Complexes on the Distribution of Zinc in Calcareous Soil and Zinc Uptake by Maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5760-5767.

Alvarez-Fernandez, A., García-Marco, S., and Lucena, J. J. (2005): Evaluation of Synthetic Iron(III)-Chelates (EDDHA/Fe³⁺, EDDHMA/Fe³⁺ and the Novel EDDHSA/Fe³⁺) to Correct Iron Chlorosis. *European Journal Agronomy*, 22, 119–130.

Amrani, M., Westerfall, D.G., and Peterson, G.A. (1999): Influence of Water Solubility of Granular Zinc Fertilizers on Plant Uptake and Growth. *Journal of Plant Nutrition*, 22, 1815-1827.

Angelone, M., and Bini, C. (1992): In *Biogeochemistry of Trace Metals*. Adriano, D.C. (Ed.). Lewis Publishers. Boca Raton.

Arancon, N.Q., Edwards C.A., Bierman P., Welch C., and Metzger J.D. (2004): Influences of Vermicomposts on Field Strawberries: 1. Effects on Growth and Yields. *Bioresource Technology*, 93, 145-153.

Arce, J.P., Storey, J.B., and Lyons, C.G. (1992): Effectiveness of Three Different Zinc Fertilizers and Two Methods of Application for the Control of “Little-Leaf” in Peach Trees in South Texas. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 23, 1945-1962.

Arnon, D.I., and Stout, P.R. (1939): The Essentiality of Certain Elements in Minute Quantity for Plants with Special Reference to Copper. *Plant Physiology*, 14, 371-375.

Ashmean, H.D., and Samford, R.A. (2008): Increasing Protein/Energy Digestion by Feeding Metal Amino Acid Chelates . *International Journal of Applied Research in Veterinary*, 6, 38-45.

Bagci, S. A., Ekiz, H., Yilmaz, A., and Cakmak, I. (2007): Effects of Zinc Deficiency and Drought on Grain Yield of Field-Grown Wheat Cultivars in Central Anatolia. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193, 198–206.

Barak, P., and Helmke, P.A. (1993): The Chemistry of Zinc. In *Zinc in Soils and Plants*. Robson, A.D. (Ed), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Bastani, D., Safekordi, A. A., Alihosseini, A., and Taghikhani, V. (2006): Study of Oil Sorption by Expanded Perlite at 298.15 K. *Separation and Purification Technology*, 52, 295–300.

BOE. Boletín Oficial del Estado (2005), pp. 25592-25669.

Boeriu, C. G., Bravo, D., Gosselink, R. J. A., and van Dam, J. E. G. (2004): Characterization of Structure Dependent Functional Properties of Lignin with Infrared Spectroscopy. *Industrial Crops Production*, 20, 205–218.

Breteler, H., and Arnozis, P.A. (1985): Effects of Amino Compounds on Nitrate Utilization by Roots of Dwarf Bean. *Phytochemistry*. 24, 653-657.

Brown, J.C. (1969): Agricultural Use of Synthetic Metal Chelates. *Soil Science Society of America Journal*, 33, 59-61.

Brown, P.H., Cakmak, I., and Zhang, Q. (1993): Form and Function of Zinc in Plants. In *Zinc in Soils and Plants*. Robson, A.D. (Ed), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Bucheli-Witschel, M., and Egli, T. (2001): Environmental Fate and Microbial Degradation of Aminopolycarboxylic Acids. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 69–106.

Buckau G., Hooker, P., and Moulin, V. (2000): Versatile Components of Plants, Soils and Water. In *Humic Substances*. Ghabbour E.A., and Davies G. (Eds.), RSC, Cambridge.

Burriel, F., Arribas, J. S., Hernandez, J., and Lucena, F. *Química Analítica Cualitativa* Ed. Paraninfo. 2003.

Buylov, V.V., Lichko, R.P., and Volokitin, M.P. (1979): Improvement of the Properties of Solonchik Soils with Ammonium Lignosulfonate. *Soviet Soil Science (English Translation)*. 11, 449-460.

Cadvar, A.D., Kalaycioglu, H., and Hiziroglu, S. (2008): Some of the Properties of Oriented Strandboard Manufactured Using Kraft Lignin Phenolic Resin. *Journal of Materials Processing Technology*, 202, 559-563.

Cakmak, I. (2002): Plant Nutrition Research: Properties to Meet Human Needs for Food in Sustainable Ways. *Plant and Soil*, 247, 3-24.

Cakmak, I. (2008): Enrichment of Cereal Grains with Zinc: Agronomic or Genetic Biofortification?. *Plant and Soil*. 302, 1-17.

Cakmak, I., Ekiz, H., Yilmaz, A., Torun, B., Köleli, N., Gültekin, I., Alkan, A., and Eker, S. (1997): Different Response of Rye, Triticale, Bread and Durum Wheats to Zinc Deficiency in Calcareous Soils. *Plant and Soil*, 188, 1-10.

Cakmak, I., Graham, R., and Welch, R.M. (2002): Agricultural and Molecular Genetic Approaches to Improving Nutrition and Preventing Micronutrient Malnutrition Globally. In *Encyclopaedia of Life Support Systems*. Cakmak, I. Welch, R.M. (Eds.). UNESCO-EOLSS. UK, 3490 pp.

Cakmak, I., Ozkan, H., Braun, H. J., Welch, R. M., and Romheld, V. (2000): Zn and Iron Concentrations in Seeds of Wild, Primitive, and Modern Wheats. In *Food and Nutrition Bulletin*; The United Nations University: Tokyo, Japan; Vol. 21, No. 4.

Cakmak, I., Yilmaz, A., Kalayci, M., Ekiz, H., Torun, B., Erenoglu, B., and Braun, H.J. (1996): Zinc Deficiency as a Critical Problem in Wheat Production in Central Anatolia. *Plant and Soil*, 180, 165-172.

Callebaut, F., Gabriels, D., and Boodt, M.D. (1979): The Effect of Polymer Structure on Soil Physio-Chemical Properties and Soil Water Evaporation. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*, 29, 723-729.

Canselier, J.P. (2008): Production of Alkanosulfonates and Related Compounds (High-Molecular-Weight Sulfonates). In *Handbook of Detergents*. Zoler, V., and Sosis, P. (Eds.). CRC Press. Boca Raton.

Cihacek, L.J. (1984): Economic Soil Treatment of Iron Chlorosis in Grain Sorghum Grown on a Gypsum Affected Soil. *Journal of Plant Nutrition*, 7, 329-340.

Cottenie, A., and Verloo, M. (1988): Analytical Diagnosis of Soil Pollution with Heavy Metals. *Journal of Analytical Chemistry*, 317, 389-393.

Cottenie, A., Verloo, M., Kiekens, L., and Velghe, G. (1982) In *Biological and Analytical Aspects of Soil Pollution*. Cottenie, A. (Ed). State University of Gent.

Graham, R.D., Ascher, J.S., and Hynes, S.C. (1992): Selecting Zinc-Efficient Cereal Genotypes for Soil of Low Zinc Status. *Plant and Soil*, 146, 241-250.

CE no. 2003/2003 Regulation of the European Parliament from October of 2003 relating to fertilizers.

Cumbus, I. P. (1985): Development of Wheat Roots under Zn Deficiency. *Plant and Soil*, 83, 313-316

De Liñán, C. *Vademécum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales*; Ediciones Agrotécnicas: Madrid, Spain, 2000-2009.

Dindelaker, B., Römheld, V., and Marschner, H. (1989): Citric Acid Excretion and Precipitation of Calcium Citrate in the Rhizosphere of White Lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant, Cell & Environment*, 12(3), 285-292.

Docquier, S., Kevers, C., Lambé, P., Gaspar, T., and Dommes, J. (2007): Beneficial Use of Lignosulfonates in Vitro Plant Cultures: Stimulation of Growth, of Multiplication and of Rooting. *Plant Cell Tissue Organic Culture*, 90, 285-291.

Duivenbooden, N.V., Wit, C.T., and Keulen, H.V. (1995): Nitrogen, Phosphorus and Potassium Relations in Five Major Cereals Reviewed in Respect to Fertilizer Recommendations Using Simulation Modelling. *Nutrient Cycling in Agrosystems*, 44, 37-49.

Eide, D.J. (2005): The ZIP Family of Zinc Transporters. In *Zinc Finger Proteins*. Ed. Springer US. pp, 261-264.

Ekeberg, D., Gretland, K.S., Gustafsson, J., Braten, S.M., and Fredheim, G.E. (2006): Characterisation of Lignosulfonates and Kraft Lignin by Hydrophobic Interaction Chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 565, 121-128.

FAO. (2006): The State of Food and Agriculture (SOFA). WHO, Geneva.

FAO/WHO. (2004): Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition. Rome, Italy.

Finck, A. Fertilizantes y Fertilización. Fundamentos y Métodos para la Fertilización de los Cultivos. Ed. Reverté. Barcelona. 1989. pp. 115-119.

Foley, J.A., DeFries, R., Asier, G.P., Barford, C., Carpenter, S.R., Chapin, F.S., Coe, M.T., Daily, G.C., Gibbs, H.K., Helkowski, J.H., Holloway, T., Howard, E.A., Kucharik, C.J., Monfreda, C., Patz, J.A., Prentice, I.C., Ramankutty, N., and Snyder, P.K. (2005): Global Consequences of Land Use. *Science*, 309, 570-574.

Fredheim, G.E., Christensen, C., and Bjorn, E. (2005): Polyelectrolyte Complexes: Interactions between Lignosulfonate and Chitosan. *Biomacromolecules*, 4, 232-239.

Gangloff, W. J., Westfall, D. G., Peterson, G. A., and Mortvedt, J. J. (2002): Relative Availability Coefficients of Organic and Inorganic Zn Fertilizers. *Journal of Plant Nutrition*, 25, 259–273.

Gangloff, W.J., Westfall, D.G., Peterson, G.A., and Mortvedt, J.J. (2006): Mobility of Organic and Inorganic Zinc Fertilizers in Soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 37, 199-209.

Gargulak, J.D., and Lebo, S.E. (2000): Commercial Use of Lignin-Based Materials. In *Glasser, W.G., Northey, R.A., and Schultz, T.P. (Eds.). Lignin: Historical, Biological, and Materials Perspectives*. ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 307.

Ghasemi-Fasei, R., and Ronaghi, A. (2008): Interaction of Iron with Copper, Zinc, and Manganese in Wheat as Affected by Iron and Manganese in a Calcareous Soil. *Journal of Plant Nutrition*, 31, 839-848.

Giordano, P.M., and Mortvedt, J.J. (1969): Response of Several Maize Hybrids to Level of Water-Soluble Zinc in Fertilizers. *Soil Science Society of American Process*, 33, 145-148.

Gonzalez, D., Obrador, A., Lopez-Valdivia, L. M., and Alvarez, J. M. (2008): Effect of Zinc Source Applied to Soils on its Availability to Navy Bean. *Soil Science Society of America Journal*, 72, 641–649.

Goos, R. J., Johnson, B. E., and Thiolllet, M. A. (2000): A Comparison of the Availability of Three Zn Sources to Maize (*Zea mays* L.) under greenhouse conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 31, 343–347.

Gosselink, R.J.A., de Jong, E., Guran, B., and Abacherli, A. (2004): Co-ordination Network for Lignin Standardisation, Production and Applications Adapted to Market Requirements (EUROLIGNIN). *Industrial Crops and Products*, 20, 121-129.

Graham, R.D. (2008): Micronutrient Deficiencies in Crops and Their Global Significance. In *Micronutrients Deficiencies in Global Crop Production*. Alloway, B.J, (Ed.) Springer: Reading, United Kingdom, pp 41-61.

Graham, R.D. (1984): Breeding for Nutritional Characteristics in Cereals. *Advances in Plant Nutrition*, 1, 57-102.

Graham, R.D., Ascher, J.S., and Hynes, S.C. (1992): Selecting Zinc-Efficient Cereal Genotypes for Soil of Low Zinc Status. *Plant and Soil*, 146, 241-250.

Graham, R.D., and Welch, R.M. Breeding for Staple-Food Crops with High Micronutrients Density: Working Papers on Agricultural Strategies for Micronutrients, N° 3. *International Food Policy Institute*, Washington DC. 1996.

Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L., and Eide, D.J. (1998): Identification of a Family of Zinc Transporter Genes from Arabidopsis that Respond to Zinc Deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 7220-7224.

Grusak, M.A., Pearson, J.N., and Marentes, E. (1999): The Physiology of Micronutrient Homeostasis in Field Crops. *Field Crops Research*, 60, 41-56.

Hacisalihoglu, G., and Kochian, L. V. (2003): How do Some Plants Tolerate Low Levels of Soil Zn? Mechanisms of Zn efficiency in crop plants. *New Phytologist*, 159, 341–350.

Hadimani, A.S., Surya, P.R., Parvathappa, H.C., and Raghavendra, K.R. (1974): Effect of Water Soluble Organic Substances From Different Types of Leaf and Needle Litter on the Downward Movement of Manganese in Sandy Soil. *Plant and Soil*, 40, 365-372.

Häni, H., and Gupta, S. (1983) In *Environmental Effects of Organic and Inorganic Contaminants in Sewage Sludge*. Davis, R.D., Hucker, G., and L'Hermite, P. (Eds.). Reidel. Dordrecht.

Havlin, J. L., and Soltanpour, P. N. (1981): Evaluation of the $\text{NH}_4\text{H-CO}_3\text{-DTPA}$ Soil Test for Iron and Zinc. *Soil Science Society of America Journal*, 45, 70–75.

Havelcová, M., Mizera, J., Sýkorová, I., and Pekár, M. (2009): Sorption of Metal Ions on Lignite and the Derived Humic Substances. *Journal of Hazardous Materials*, 161, 559-564.

Hegert, G. W., Rhem, G. W. and Wiese, R. A. (1984): Field Evaluation of Zn Sources Band Applied with Ammonium Polyphosphate Suspensions. *Soil Science Society of America Journal*, 48, 1190–1193.

Hernandez, D., Plaza, C., Senesi, N., and Polo, A. (2006): Detection of Copper (II) and Zinc (II) Binding to Humic Acids from Pig Slurry and Amended Soils by Fluorescence Spectroscopy. *Environmental Pollution*, 143, 212-220.

Hernández-Apaolaza, L., and Lucena J.J. (2001): Fe(III)-EDDHA and -EDDHMA Sorption on Ca-Montmorillonite, Ferrihydrite, and Peat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5258-5264.

Hettiarachchi, G.M., McLaughlin, M.J., Scheckel, K.G., Newville, M., Sutton, S., and Lombi, E. (2007): Evidence for Different Reaction Pathways for Liquid and Granular Micronutrients in a Calcareous Soil. *Soil Science and Society of America Journal*, 72, 98-110.

Hotz, C., and Brown, K.H. (2004): Assessment of the Risk of Zinc Deficiency in Populations and Options for its Control. In *International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG). Food Nutrition Bulletin*. 25, 94-204. International Nutrition Foundation for The United Nations University, Tokyo.

Hough, R.L., Breward, N., Young, S.D., Crout, N.M.J., Tye, A.M., Moir, A.M., and Thornton, I. (2004): Assessing Potential Risk of Heavy Metal Exposure from Consumption of Home-Produced Vegetables by Urban Populations. *Environmental Health Perspectives*, 112, 215-221.

Huang, C.Y., Barker, S.J., Langridge, P., Smith, F.W., and Graham, R.D. (2000): Zinc Deficiency Up-Regulates Expression of High-Affinity Phosphate Transporter Genes in Both Phosphate-Sufficient and -Deficient Barley (*Hordeum vulgare* L. cv Weeah) Roots. *Plant Physiology*, 124, 415-422.

Hussain, M.I., Shah, S.H., Hussain, S., and Iqbal, K. (2002): Growth, Yield, and Quality Response of Three Wheat (*Triticum aestivum* L.) Varieties to Different Levels of N, P and K. *International Journal of Agriculture and Biology*. 4(3), 362-364.

Imtiaz, M., Alloway, B.J., Memon, M.Y., Khan, P., Siddiqui, S-U-H., Aslam, M., and Shah, S.K.H. (2006): Zinc Tolerance in Wheat Cultivars as Affected by Varying Levels of Phosphorus. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 37, 1689-1702.

ISO 3936. *Water for analytical laboratory use*. Specification and test methods. 1987.

Iyengar, S.S., Martens, D.L., and Millar, P. (1981): Distribution and Plant Availability of Soil Zinc Fractions. *Soil Science Society of American Journal*, 45, 735-739.

Jackson, W. A., Heinly, N. A., and Caro, J. H. (1962): Trace Elements in Fertilizers, Solubility Status of Zinc Carriers Intermixed with NPK Fertilizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 10, 361-366.

Jiang, W. Z. (2006): Mn Use Efficiency in Different Wheat Cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 57, 41-50.

Jones, J. B., Jr., Wolf, B., and Mills, H. A. *Plant analysis handbook*; Micro-Macro Publishing: Athens, 1991.

Joyce, D. C., Bell, L. C., Asher, C. J., and Edwards, D. G. (1988): Thermoplastic matrix controlled-release Zn fertilizers. I. Laboratory characterization. *Fertilizer Research*, 17, 235–250.

Kabata-Pendias, A., and Pendias, H. *Trace elements in Soils and Plants* (2nd edition). CRC Press, Boca Raton. 1992.

Kalayci, M., Torun, B., Eker, S., Aydin, M., Ozturk, L., and Cakmak, I. (1999): Grain Yield, Zinc Efficiency and Zinc Concentration of Wheat Cultivars Grown in a Zinc-Deficient Calcareous Soil in Field and Greenhouse. *Field Crops Research*, 63, 87-98.

Kaminska, W., Kardasz, T., Roszyk, E., Roszyk, S., Strahl, A., Strojek, Z. (1983): Methods of Dry Mineralization of Vegetal Material for Determination of the Content of Some Macro- and Microelements. *Communications in Soil Science of Plant Analysis*, 34, 133–152.

Khoshgoftarmanesh, A. H., Shariatmadari, H., Karimian, N., Kalbasi, M., and Khajehpour, M. R. (2004): Zn Efficiency of Wheat Cultivars Grown on Saline Calcareous Soil. *Journal of Plant Nutrition*, 27, 1953–1962.

Kiekens, L. (1995): Zinc. In *Heavy Metals in Soils* (2nd Edition). Blackie Academic and Professional, London. pp 284-305.

Kiekens, L., Camerlynck, R. (1982): Transfer Characteristics for Uptake of Heavy Metals by Plants. *Landwirtsch. Forsch.* 39, 255-261.

Kitson, R. E., and Mellon, M. G. (1944): Colorimetric Determination of Phosphorus as Molybdivanadophosphoric Acid. *Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition*, 16, 379–383.

Knaggs, E.A., and Nepras, M.J. (1997) In *Kirk-Othmer Encyclopaedia of Chemical Technology*. Wiley. New York.

Knezek, B.D., and Greinert, H. (1971): Influence of Soil Fe and MnEDTA Interactions upon the Fe and Mn Nutrition of Bean Plants. *Journal of Agronomy*, 63, 619-621.

Kochian, L. V. (2000): Molecular Physiology of Mineral Nutrient Acquisition, Transport, and Utilization. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*; Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (Eds.); American Society of Plants Physiologists: Rockville, pp 1204-1249.

Kochian, L. V. (1993): Zinc Absorption From Hydroponics Solutions by Plant Roots. In *Zinc and Soil Plants*; Robson, A. D., Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Belgium, pp 119-134.

Kuo, S. (1996): Phosphorus. In *Methods of Soil Analysis, Part 3*; Sparks, D. I. Ed.; Madison, WI, pp 869-920.

László, M. (2008): Manganese Requirement of Sunflower (*Helianthus annuus* L.), Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and Triticale (x *Triticosecale* W.) at Early Stage of Growth. *European Journal of Agronomy*, 28, 586-596.

Leuchtenberger W., Huthmacher K., and Drauz K. (2005) Biotechnological Production of Amino Acids and Derivates: Current Status and Prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 1-8.

Lindsay, W.L. *Chemical Equilibria in Soils*. Ed. John Wiley and Sons. New York. 1979.

Lindsay, W.L. (1991): Inorganic Equilibria Affecting Micronutrients in Soils. In: *Micronutrients in agriculture*, R.J. Luxmoore, (Ed); Soil Science Society of America Inc., Madison, WI, pp. 90–592.

Lindsay, W.L., and Norvell, W.A. (1978): Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese and Cooper. *Soil Science Society of America Journal*, 42, 421-428.

Loneragan, J. F., Grunes, D. L., Welch, R. M., Aduayi, E. A., Tengah, A., Lazar, V. A., and Cary, E. E. (1982): Phosphorus Accumulation and Toxicity in Leaves in Relation to Zn Supply. *Soil Science Society of America Journal*, 46, 345–352.

Lucena, J.J. (2003): Fe Chelates for Remediation of Fe Chlorosis in Strategy I Plants. *Journal of Plant Nutrition*, 26, 1969-1984.

Lucena, J.J. (2006): Synthetic Iron Chelates to Correct Iron Deficiency in Plants. In *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*; Barton., L.; Abadia, J. (Eds.); Springer: Dordrecht, The Netherlands, pp 103-128.

Ma, W., Li, J., Ma, L., Wang, F., Sisak, I., Cushman, G., and Zhang, F. (2009): Nitrogen Flow and Use Efficiency in Production and Utilization of Wheat, Rice, and Maize in China. *Agricultural Systems*, 99, 53-63.

Ma, X., and Pawlik, M. (2007): The Effect of Lignosulfonates on the Floatability of Talc. *International Journal of Mineral Process*, 83, 19–27.

Maftoun, M., and Karimian, N. (1989): Relative Efficiency of Two Zinc Sources for Maize (*Zea mays* L.) in Two Calcareous Soils from an Arid Area of Iran. *Agronomie*, 9, 771-775.

Malakouti, M.J. (2008): The Effect of Micronutrients in Ensuring Efficient Use of Macronutrients. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32, 215-220.

Malakouti, M.J. (2007): Zinc is Neglected Element in the Life Cycle of Plants: A review. *Middle East Russian Journal of Plant Science Biotechnology*, 1, 1-12.

Malakouti, M. J., Tehrani, M. M., Ziaeyan, A., Majidi, A., Ghaderi, J., Bybordi, A., Keshavarz, P., Gheibi, M. N., and Savaghebi, G. R. (2005): Effects of Balanced Fertilization on the Weight of Thousand Seeds for Different Wheat Cultivars the Calcareous Soils of Iran. XV International Plant Nutrition Colloquium (IPNC), Beijing, China.

Marcar, N.E., and Graham, R.D. (1986): Effect of Seed Manganese Content on the Growth of Wheat (*Triticum aestivum*) Under Manganese Deficiency. *Plant and Soil*, 96, 165-173.

Marschner, H. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Ed. Academic Press. Amsterdam. 1995.

Martens, D. C., and Westermann, D. T. (1991): Fertilizer Applications for Correcting Micronutrients Deficiencies. In *Micronutrients in Agriculture*, 2nd ed.; Mortvedt, J. J., Cox, F. R., Shuman, L. M., Welch, R. M., Eds.; Soil Science Society of America: Madison, WI; pp 549-592.

Martin-Ortiz, D., Hernandez-Apaolaza, L., and Garate, A. (2009a): Efficiency of a Zinc Lignosulfonate as Zn source for Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Maize (*Zea mays* L.) Under Hydroponic Culture Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 226-231.

Martin-Ortiz, D., Hernandez-Apaolaza, L., and Garate, A. (2009b): Efficiency of a NPK Fertilizer with Adhered Zinc Lignosulfonate as a Zinc Source for Maize (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9071-9078.

Mascagni Jr, H.J., and Cox, F.R. (1984): Diagnosis and Correction of Manganese Deficiency in Corn. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 11, 1323-1333.

Mascagni Jr, H.J., and Cox, F.R. (1985): Evaluation of Inorganic and Organic Manganese Fertilizer Sources. *Soil Science Society of America Journal*, 49, 458-461.

Matson, P.A., Parton, W.J., Power, A.G., and Swift, M.J. (1997): Agricultural Intesification and Ecosystem Properties. *Science*, 277, 504-509.

May, G. M., and Pritts, M. P. (1993): Phosphorus, Zn, and Boron Influence Yield Components in "Earlyglow" Strawberry. *Journal of the America Society for Horticultural Science*, 118, 43-49.

Mazé, P. (1915): Détermination des Elements Minéraux Rares Mécessaires au Développement du Mäis. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'académie des Sciences*, 160, 211-214.

Meier, J.N., Fyles, J.W., Mackenzie, A.F., and O'Halloran, I.P. (1993): Effects of Lignosulphonate Fertilizer Applications on Soil Respiration and Nitrogen Dynamics. *Canadian Journal of Soil Science*, 73, 233-242.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion. Metodos Oficiales de Analisis; MAPA: Madrid, 1994; Vol. III.

Modaihsh, A.S. (1990): Zn Diffusion and Extractability as Affected by Zn Carrier and Soil Chemical Properties. *Fertilizer Research*, 25, 85-91.

Moraghan, J.T., and Mascagni Jr, H.J. (1991): Environmental and Soil Factors Affecting Micronutrient Deficiencies and Toxicities. In *Micronutrients in Agriculture* (2nd edition). Mortvedt, J.J., Cox, F.R., Shuman, L.M., and Welch, R.M. (Eds.). Soil Science Society of America. Madison.

Mortvedt, J. J. (1979): Corn Response to Zn Sulfate Applied Alone or with Suspensions. *Fertilizer Solutions*, 23, 764–779.

Mortvedt, J.J. (1985): Micronutrient Fertilizers and Fertilization Practices. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 7, 221-235.

Mortvedt, J.J. (1992): Crop Response to Level of Water-Soluble Zinc in Granular Fertilizers. *Fertilizer Research*, 33, 249-255.

Mortvedt, J.J. (1994): Needs for Controlled-Availability Micronutrient Fertilizers. *Fertilizers Research*, 38, 213-221.

Mortvedt, J.J., and Gilkes, R.J. (1993): Zinc Fertilizers. In *Zinc in Soils and Plants*; Robson., A.D.; Mortvedt, J.J. (Eds.); Kluwer Academic Publishers: Washington D.C., pp 38-45.

Mortvedt, J.J., and Giordano, P.M. (1969): Extractability of Zinc Granulated with Macronutrient Fertilizers in Relation to its Agronomic Effectiveness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17, 1272-1275.

Motamed, A. (2006): Effects of Zn, Mn and Fe Fertilizers on Quantitative and Qualitative Yield of Bread Wheat Cultivar Pishtaz: Scientific Short Article. *Seed and Plant*, 21, 631-634.

Nayyar, V. K., and Takkar, P. N. (1980): Evaluation of Various Zn Sources for Rice Grown on Alkali Soil. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd*, 143, 489–493.

Nayyar, V.K., Sadana, U.S., and Takkar, T.N. (1985): Methods and Rates of Application of Mn its Critical Levels for Wheat Following Rice on Coarse Textured Soils. *Fertilizer Research*, 8, 173-178.

Nicholson, F., Smith, S.R., Alloway, B.J. and Chambers, B.J. (2003): An Inventory of Heavy Metals Inputs to Agricultural Soils in England and Wales. *Science of the Total Environment*. 311, 205-220.

Niemi, K., Kevers, C., and Häggman, H. (2005): Lignosulfonate Promotes the Interaction Between Scots Pine and an Ectomycorrhizal Fungus *Pisolithus tinctorius* in Vitro. *Plant and Soil*, 271, 243-249.

NRC (National Research Council). *Alternative Agriculture*. Ed. National Academy Press. Washington D.C. 1989.

Obrador, A., Novillo, J., and Alvarez, J.M. (2003): Mobility and Availability to Plants of Two Zinc Sources Applied to a Calcareous Soil. *Soil Science Society of America Journal*, 67, 564-572.

Ohki, K. (1984): Manganese Deficiency and Toxicity Effects on Growth, Development, and Nutrient Composition in Wheat. *Agronomy Journal*, 76, 213-218.

Ohmori, S., Kataoka, M., and Koyama, H. (2007): Stability of Cyanocobalamin in Sugar-Coated Tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 337, 161-168.

Olsen, S.R. (1991) In *Micronutrients in Agriculture* (2nd edition). Mortvedt, J.J., Cox, F.R., Shuman, L.M., and Welch, R.M. (Eds.). Soil Science Society of America. Madison.

Ouyang, X., Quiu, X., and Chen, P. (2006): Physicochemical Characterization of Calcium Lignosulfonate – A Potentially Useful Water Reducer. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects*, 282-283, 489-497.

Ozkutlu, F., Torun, B., and Cakmak, I. (2006): Effect of Zinc Humate on Growth of Soybean and Wheat in Zinc-Deficient Calcareous Soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 37, 2769-2778.

Page, V., and Feller, U. (2005): Selective Transport of Zinc: Manganese, Nickel, Cobalt and Cadmium in the Root System and Transfer to the Leaves in Young Wheat Plants. *Annals of Botany*, 96, 425-434.

Pang, Y.-X., Qiu, X.-Q., Yang, D.-J., and Lou, H.-M. (2008): Influence of Oxidation, Hydroxymethylation and Sulfomethylation on the Physicochemical Properties of Calcium Lignosulfonate. *Colloids and Surfaces A*, 312, 154–159.

Parker, D. R., Aguilera, J. J., and Thomason, D. D. (1992): Zn-Phosphorus Interactions in Two Cultivars of Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) Grown in Chelator-Buffered Nutrient Solutions. *Plant and Soil*, 143, 163–177.

Peña-Méndez, E.M., Havel, J., and Patočka, J. (2005): Humic Substances- Compounds of Still Unknown Structure: Applications in Agriculture, Industry, Environment, and Biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*, 3, 13-24.

- Petkov, M. (1983): Effect of Increasing Fertilization Rates of Grain Yield Quality of Winter Soft Wheat Cultivars. *Soils and Fertilizers*, 45, 7222.
- Pfeiffer, W. H., and McClafferty, B. (2007): Biofortification: Breeding Micro- Nutrient Dense Crops. In *Breeding major food staples*; Kang, M. S., Ed.; Blackwell Science Ltd.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., and Larroche, C. (2006): Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 185-195.
- Randall, G.W., Schulte, E.E., and Corey, R.B. (1975): Effect of Soil and Foliar-Applied Manganese on the Micronutrient Content and Yield of Soybeans. *Agronomy Journal*, 67, 502-507.
- Raven, J.A. (1990): Predictions of Mn and Fe Use Efficiencies of Phototrophic Growth as a Function of Light Availability for Growth and of C Assimilation Pathway. *New Phytologist*, 116, 1-18.
- Rengel, Z., Batten, G.D., and Crowley, D. E. (1999): Agronomic Approaches for Improving the Micronutrient Density in Edible Portions of Field Crops. *Field Crops Research*, 60, 27-40.
- Reuter, D.J., Alston, A.M., and McFarlane, J.D. (1988): Occurrence and Correction of Manganese Deficiency in Plants. In *Manganese in Soils and Plants*. Graham, R.D., Hannan, R.J., and Uren, N.C. (Eds.). Kluwer Academic, Dordrecht. pp 205-224.
- Rico, M.I., Alvarez, J.M., and Mingot, J.I. (1996): Efficiency of Zinc Ethylenediaminetetraacetate and Zinc Lignosulfonate Soluble and Coated Fertilizers for Maize in Calcareous Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3219-3223.
- Rodríguez-Lucena, P., Tomasi, N., Pinton, R., Hernandez-Apaolaza, L., Lucena, J.J., and Cesco, S. (2009a): Evaluation of ⁵⁹Fe-Lignosulfonates complexes as Fe-Sources for Plants. *Plant and Soil*. DOI: 10.1007/s11104-009-0091-1
- Rodríguez-Lucena, P., Lucena, J.J., and Hernández-Apaolaza, L. (2009b): Relationship Between the Structure of Fe-Lignosulfonate Complexes Determined by FTIR Spectroscopy and their Reduction by the Leaf Fe Reductase. In *UC Davis: The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI*. California.
- Sadana, U.S., Sharma, P., Castañeda Ortiz, N., Samal, D., and Claassen, N. (2005): Manganese Uptake and Mn Efficiency of Wheat Cultivars are Related to Mn-Uptake Kinetics and Root Growth. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168, 581-589.

- Samadi, A., Gilkes, R. J. (1999): Phosphorus Transformations and Their Relationships with Calcareous Soil Properties of Southern Western Australia. *Soil Science Society America Journal*, 63, 809–815.
- Sauerbeck, D.R., and Styperek, P. (1985) In *Chemical Methods for Assessing Bio-Available Metals in Sludges and Soils*. Leschber, R., Davis, R.D., and L'Hermite, P. (Eds.). Elsevier. London.
- Senesi, G.S., Baldassarre, G., Senesi, N., and Radina, B. (1999): Trace Element Inputs Into Soils by Anthropogenic Activities and Implications for Human Health. *Chemosphere*, 2, 343-377.
- Shen, Q., Zhang, T., and Zhu, M-F. (2008): A Comparison of the Surface Properties of Lignin and Sulfonated Lignins by FTIR Spectroscopy and Wicking Technique. *Colloids and Surfaces*. 320, 57-60.
- Shivay, Y. S., Kumar, D., Prasad, R., and Ahlawat, I. P. S. (2008a): Relative Yield and Zinc Uptake by Rice From Zinc Sulphate and Zinc Oxide Coatings Onto Urea. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 80, 181–182.
- Shivay, Y.S., Prasad, R., and Rahal, A. (2008b): Relative Efficiency of Zinc Oxide and Zinc Sulphate-Enriched Urea for Spring Wheat. *Nutrient Cycling in Agroecosystem*, 82, 259-264.
- Sims, S.T. (1986): Soil pH Effects on the Distribution and Plant Availability of Manganese, Copper and Zinc. *Soil Science Society of American Journal*, 50, 367-373.
- Sinclair, A.H., and Edwards A.C. (2008): Micronutrient Deficiency Problems in Agricultural Crops in Europe. In *Micronutrients Deficiencies in Global Crop Production*. Alloway BJ (Ed). Springer Science + Business Media, Reading, United Kingdom, pp. 225-244.
- Singh, B. R. (1974): Migration of Ion in Soils I. Movement of Zn⁶⁵ from Surface Application of Zinc Sulphate in Soil Columns. *Plant and Soil*, 41, 619–628.
- Singh. O.V., and Kumar, R. (2007): Biotechnological Production of Gluconic Acid: Future Implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 713-722.
- Singh, B., Kumar, S., Natesan, A., Singh, B.K., and Usha, K. (2005): Improving Zinc Efficiency of Cereals under Zinc Deficiency. *Current Science*, 88, 36-44.
- Slaton, N.A., Gbur Jr, E.E., Wilson Jr, C.E., and Norman, R.J. (2005): Rice Response to Granular Zinc Sources Varying in Water-Soluble Zinc. *Soil Science Society of America Journal*, 69, 443-452.

- Smaling, E.M.A. (1993): Soil Nutrient Depletion in Sub-Saharan Africa. In *The Role of Plants Nutrients for Suitable Food Crop Production in Sub-Saharan Africa*. Ed. H. Van Reuler and W.H. Prims. Leidschendan.
- Smook, G.A. *Handbook for Pulp and Paper Technologists* (2nd edition). Angus Wilde Publications. Vancouver. 1992.
- Soltani, N., Conn, K.L., Abbasi, P.A., and Lazarovits, G. (2002): Reduction of Potato Scab and Verticillium Wilt with Ammonium Lignosulfonate Soil Amendment in Four Ontario Potato Fields. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24, 332-339.
- Soltanpour, P. N., and Workman, S. (1979): Modification of the NH_4HCO_3 -DTPA Soil Test to Omit Carbon Black. *Communications in Soil Science Plant Analysis*, 11, 1411–1420.
- Sommer, A.L., and Lipman, C.B. (1926): Evidence on the Indispensable Nature of Zinc and Boron for Higher Green Plants. *Plant Physiology*, 1, 231-249.
- Stadtman, E.R., and Levine, R.L. (2003): Free Radical-Mediated Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acids Residues in Proteins. *Amino Acids*, 25, 207-218.
- Stevenson, F.J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. Wiley-Interscience, New York .1994.
- Stewart, J.A., and Berger, K.C. (1965): Estimation of Available Soil Zinc using Magnesium Chloride as Extractant. *Soil Science*, 100, 244-248.
- Suzuki, H., Iiyama, K., Okubo, A., Yamazaki, S., and Toda, S. (1989): Lignosulfonate from Waste Liquor of Pulping Process Activates Murine Macrophages and Causes Proliferation of Bone Marrow Cells. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 1197-1199.
- Takkar, P.N., Mann, M.S., Bansal, R.L., Randhawa, N.S., and Singh, H. (1976): Yield and Uptake Response of Maize to Zinc, as Influenced by Phosphorus Fertilization. *Agronomy Journal*, 68, 942-946.
- Telysheva, G., Dizhbite, T., and Paegle, E. (2001): Surface-Active Properties of Hydrophobized Derivated of Lignosulfonates: Effect of Structure of Organosilicon Modifier. *Journal of Applied Polymer Science*, 82, 1013-1020.
- Tomaszewska, M., and Jarosiewicz, A. (2008): Encapsulation of Mineral Fertilizer by Polysulfone using a Spraying Method. *Desalination*, 198(1-3), 346-352.
- Trierweiler, J.F., and Lindsay, W.L. (1966): EDTA-Ammonium Carbonate Soil Test for Zine. *Soil Science Society of America*, 33, 49-54.

Uren, N.C. (1990): The Movement and Distribution of Manganese Added to Soil. *Australian Journal of Soil Research*, 28, 677-683.

Van der Kriecken, W.M., Kodde, J., Visser, M.H.M., Tsadakas, D., Blaakmeer, A., de Groot, K., and Leegstra, L. (1997): Increased Induction of Adventitious Rooting by Slow Release Auxins and Elicitors. In *Biology of Root Formation and Development*. Altman, A., and Waisel, Y. (Eds.). Plenum Press, New York. pp 95-104.

Vazquez, S., and Carpena-Ruiz, R. (2005): Use of Perlite in Cadmium Plant Studies: an Approach to Polluted Soil Conditions. *Journal Environmental Monitoring*, 7, 1355–1358.

Vián, O. *Introducción a la Química Industrial*. Ed. Alambra. Madrid. 1976.

Viets, F.G. (1962): Micronutrient Availability, Chemistry and Availability of Micronutrients in Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 10, 174-178.

Viets, F.G. Jr., Boawn, L.C., and Crawford, C.L. (1954): Zinc Contents and Deficiency Symptoms of 26 Crops Grown on a Zinc-Deficient Soil. *Soil Science*, 78, 305-316.

Villén, M., Lucena, J.J., Cartagena, M.C., Bravo, R., García-Mina, J.M., and Martín de la Hinojosa, M.I. (2007): Comparison of Two Analytical Methods for the Evaluation of the Complexed Metal in Fertilizers and the Complexing Capacity of Complexing Agents. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55, 5746-5753.

Wang, D., Lin, H., Peng, J., Xiao, X., and Liao, Z. (2004): Biological Availability of Zinc Lignosulfonate on Calcareous Soil of North Guoangdong Province. *Journal of Applied Ecology*, 15, 1236-1240.

Wang, D., Peng, J., Xiao, X., and Liao, Z. (2004): Using Paper Making Alkaline Lignin to Produce Zinc Lignosulfonate and its Effect on Corn Growth. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 10, 78–81.

White, P.J., Broadley, M.R. (2005): Biofortifying Crops With Essential Mineral Elements. *Trends Plants Science*, 10, 586-593.

Wolf, B. (1982): A Comprehensive System of Leaf Analyses and its Use for Diagnosing Crop Nutrient Status. *Communications in the Soil Science and Plant Analysis*, 13, 1035-1059.

Wood, S., Sebastian, K., and Scherr, S.J. (2000): Pilot Analysis of Global Ecosystems. In *Agroecosystems*. Ed. International Food Policy Research Institute and World Resources Institute. Washington D.C.

World Health Organization (WHO). The World Health Report. Geneva. 2002.

- Wu, L., Liu, M., and Liang, R. (2006): Preparation and Properties of a Double-Coated Slow-Release NPK Compound Fertilizer with Superabsorbent and Water-Retention. *Bioresource Technology*, 99, 547-554.
- Xie, R.J., O'Halloran, I.P., MacKenzie, A.F., and Fyles, J.W. (1994): Concurrent Transformation of Lignosulfonate Carbon and Urea Nitrogen in a Clay Soil. *Soil Science Society of America Journal*, 58, 824-828.
- Yang, D., Qiu, X., Zhou, M., and Lou, H. (2007): Properties of Sodium Lignosulfonate as Dispersant of Coal Water Slurry. *Energy Conversion and Management*, 48, 2433-2438.
- Yasrebi, J., Karimian, N., Maftoun, M., Abtahi, A., and Sameni, A.M. (1994): Distribution of Zinc Forms in Highly Calcareous Soils as Influenced by Soil Physical and Chemical Properties and Application of Zinc Sulfate. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 25, 2133-2145.
- Zhang, W., Ma, W., Ji, Y., Fan, M., Oenema, O., and Zhang, F. (2008): Efficiency, Economics, and Environmental Implications of Phosphorus Resource Use and the Fertilizers Industry in China. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 80, 131-144.
- Zhang, F., Romheld, V., and Marschner, H. (1991): Release of Zn Mobilizing Root Exudates in Different Plant Species as Affected by Zn Nutritional Status. *Journal of Plant Nutrition*, 14, 675-686.
- Zhang, W.J., and Zhang X.Y. (2007): A Forecast Analysis of Fertilizers Consumption Worldwide. *Environmental Monitoring and Assessment*, 133, 427-434.
- Zhu, Y.G., Smith, S.E., and Smith, F.A. (2001): Zinc (Zn)-Phosphorus (P) Interactions in Two Cultivars of Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) Differing in P Uptake Efficiency. *Annals of Botany*, 88, 941-945.

Referencias utilizadas de internet

- <http://www.fao.org>
- <http://www.infoagro.com>
- <http://www.mapa.es>
- <http://www.rlc.fao.org>
- <http://www.krishiworld.com>
- <http://www.msue.msu.edu>
- <http://www.anffe.com>
- <http://www.ihss.gatech.edu>



Departamento de Química Agrícola